

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

11.08.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1999年 8月13日

RECD 03 OCT 2000

WIPO

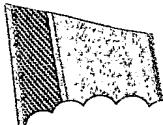
PCT

出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第229094号

出願人  
Applicant(s):

麒麟麦酒株式会社



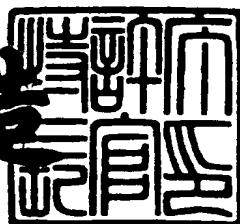
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (c)

2000年 9月18日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3073452

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-6503

【提出日】 平成11年 8月13日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 5/00

【発明の名称】 ヒトチトクロームP450遺伝子導入マウス

【請求項の数】 24

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社医薬探索  
研究所内

【氏名】 石田 功

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社医薬探索  
研究所内

【氏名】 富塚 一磨

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社医薬探索  
研究所内

【氏名】 黒岩 義巳

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県前橋市総社町1-2-2 麒麟麦酒株式会社医薬  
開発研究所内

【氏名】 大島 賢

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県前橋市総社町1-2-2 麒麟麦酒株式会社医薬  
開発研究所内

【氏名】 鈴木 瞳

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県那珂郡東海村村松2117 第一化学薬品株式会

社素材技術研究所内

【氏名】 伊藤 邦郎

【特許出願人】

【識別番号】 000253503

【氏名又は名称】 麒麟麦酒株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 03-3669-6571

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒトチトクロームP450遺伝子導入マウス

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトチトクロームP450遺伝子の少なくとも一つを保持し、同遺伝子は、同遺伝子産物の基質となる化合物により誘導発現されることを特徴とする非ヒト哺乳動物。

【請求項2】 前記ヒトチトクロームP450遺伝子がCYP3Aファミリーに属するものである請求項1記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項3】 前記ヒトチトクロームP450遺伝子は、同遺伝子を含むYACベクターの導入又は同遺伝子を含む染色体断片を用いたミクロセル融合法により導入されたことを特徴とする請求項1記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項4】 キメラ動物である請求項3記載の非ヒト動物。

【請求項5】 請求項4記載の非ヒト動物と同種の野生型非ヒト動物と、請求項4記載の非ヒト動物との交配により得られ、ヒトチトクロームP450遺伝子を含む染色体断片を保持する非ヒト動物。

【請求項6】 前記ヒトチトクロームP450遺伝子のホモログである前記非ヒト哺乳動物固有のチトクロームP450遺伝子が破壊され、その固有の遺伝子の発現が低下又は消失した請求項1記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項7】 前記非ヒト哺乳動物固有のチトクロームP450遺伝子の破壊が、Cre-loxPの系を用いて行われたものである請求項4記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項8】 マウスである請求項1～7のいずれか一項に記載の非ヒト哺乳動物。

【請求項9】 請求項1～8のいずれか一項に記載の非ヒト哺乳動物に由来し、ヒトチトクロームP450遺伝子が発現可能な細胞、又は同細胞を含む器官もしくは組織。

【請求項10】 マウスのCyp3a遺伝子群の染色体上の配置を決定するための物理的地図を作製する方法であって、下記の工程を含む方法：

(a) マウスCyp3a遺伝子の各々を特異的に検出できるPCRプライマーまたはハイブリダイゼーション用のプローブを用いたPCR又はハイブリダイゼーションによ

り、マウスBACライブラリーをスクリーニングする工程；

(b) 上記で選択されたBACクローンの末端塩基配列を決定し、同塩基配列に基づいてプライマー又はプローブを作製し、再度BACライブラリーをスクリーニングする操作を数回繰り返して、BACコンティグを作製する工程；及び

(c) 任意のマウスCyp3a遺伝子の全長cDNAプローブを作製し、同プローブを用いて上記BACコンティグに対して穏やかな条件でハイブリダイゼーションを行うことにより、Cyp3a遺伝子クラスターの両端を決定する工程。

【請求項11】 請求項10記載の方法により作製でき、マウスCyp3a遺伝子群の染色体上の配置を明らかにした物理的 地図。

【請求項12】 請求項11記載の物理的 地図に基づいてマウスCyp3a遺伝子クラスターの末端のそれぞれに相当するゲノムDNAをクローニングし、得られたクローン化断片のそれぞれを、バクテリオファージP1由来の組換え酵素Creの認識配列であるloxP配列を含むベクター中に挿入することを含む、マウスCyp3a遺伝子群欠損用ターゲティングベクターの作製法。

【請求項13】 請求項12記載の方法により作製することができる一対のベクターであって、それぞれのベクターはマウス染色体に組み込まれ、前記酵素Creが存在するときのみにloxP配列間で相同組換えが起こり、Cyp3a遺伝子クラスター全体を欠失させることを特徴とする、マウスCyp3a遺伝子群欠損用ターゲティングベクター。

【請求項14】 請求項13記載のベクターをマウスの分化多能性を保持する細胞に導入する工程と、酵素Creを発現させる工程を含む、マウス細胞のCyp3a遺伝子群を欠損させる方法。

【請求項15】 請求項14記載の方法により作製することができるマウス細胞であって、Cyp3a遺伝子群を欠損し、かつ、分化多能性を保持する細胞。

【請求項16】 請求項15記載のマウス細胞を分化させることを特徴とするCyp3a遺伝子を欠損したノックアウトマウスの作製方法。

【請求項17】 請求項16記載の方法により作製されるCyp3a遺伝子群を欠損したキメラマウス又はその子孫。

【請求項18】 請求項17記載のキメラマウス又はその子孫と、野生マウ

スとの交配により得られるCyp3a遺伝子群を欠損したマウス又はその子孫。

【請求項19】 請求項16記載のキメラマウスもしくはその子孫又は請求項17記載のマウスもしくはその子孫に由来する組織。

【請求項20】 請求項16記載のキメラマウスもしくはその子孫又は請求項17記載のマウスもしくはその子孫に由来する細胞。

【請求項21】 請求項8記載のマウス又はその子孫を、請求項17記載のキメラマウスもしくはその子孫または請求項18記載のマウスもしくはその子孫と交配させることにより作製されたマウス又はその子孫であって、ヒトP450遺伝子群を含むヒト染色体を保持し、マウスCyp3a遺伝子群を欠損したマウス又はその子孫。

【請求項22】 請求項8記載のマウスもしくはその子孫の個体、組織又は細胞を培養し、これらが保持するヒトチトクロームP450遺伝子を発現させることによって、生物学的に活性を有するヒトチトクロームP450を産生させ、同ヒトチトクロームP450を回収することを特徴とする、生物学的に活性を有するヒトチトクロームP450の製造方法。

【請求項23】 請求項21記載のマウスもしくはその子孫の個体、組織又は細胞を培養し、これらが保持するヒトチトクロームP450遺伝子を発現させることによって、生物学的に活性を有するヒトチトクロームP450を産生させ、同ヒトチトクロームP450を回収することを特徴とする、生物学的に活性を有するヒトチトクロームP450の製造方法。

【請求項24】 請求項8記載のマウスもしくはその子孫又は請求項21記載のマウスもしくはその子孫の個体、組織又は細胞に薬物を投与することを特徴とする前記薬物の薬理作用及び／または代謝を試験する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒト型の薬物代謝を示す非ヒト動物を供給することを目的とし、チトクロームP450遺伝子群を含むヒト染色体断片を導入した非ヒト動物とその作製法に関するものである。

## 【0002】

## 【従来の技術】

薬物の体内での代謝は、主に肝臓に存在するチトクロームP450（以下、「P450」ともいう。）によって行われる。P450は、多くの遺伝子からなるスーパーファミリーを形成しており、アミノ酸配列に関して相同性が40%を超えるP450を同じファミリーとし、同じファミリー内でも55%以上のアミノ酸相同性を示すものについてはサブファミリーに分類する（Nelsonら, *Pharmacogenetics*, 6:1, 1996）。同じサブファミリーに属していても、ヒトとラットのP450を比較した場合では性質の違いが認められ、基質となる物質や代謝産物に違いが認められることがある。ゆえに、ある薬物の代謝についてラットでの情報をそのままヒトに適用することはできず、ヒトでの薬物代謝を正確に予測する試験系の開発が望まれている（船江ら, *バイオサイエンスとインダストリー*, 55:81, 1997）。

## 【0003】

本来なら、ヒトでの薬物代謝を検討するのであれば、ヒト肝ミクロソームを用いるのが最善の手段であるが、ヒトの肝ミクロソームは入手が困難である。一方、遺伝子工学的な手法でヒトの酵素を比較的容易に作ることが可能になってきており、これによると安定して同一の規格のものを供給できることから、その利用が考えられる（鎌滝、（財）安評センター研究所報, 7:27, 1997）。

## 【0004】

他方、P450により代謝されて活性化された薬物の生体への影響を調べるために、*in vitro*の系が構築されている。これは、肝ミクロソームと薬物を細胞の培養液中に添加することにより、細胞外で代謝された代謝産物の前記細胞への影響をみるものである。この場合、活性化された物質は細胞膜と吸着し、一部分しか細胞内に到達しない。したがって、細胞に対する代謝産物の影響を正確に把握することができない可能性がある。細胞そのものがP450を発現する場合、細胞膜に吸着することなく侵入した薬物が細胞内で活性化すると考えられ、毒性をはじめとする代謝産物による影響を適切に再現できると考えられる。このような観点から、ヒトP450遺伝子を導入した細胞を代謝産物の毒性評価に用いることが望ましいとされている（Kamatakiら, *Toxicology Letters*, 82-83:879, 1995）。

## 【0005】

しかし、上記の *in vitro* での発現系を用いた方法は、いずれも何らかの問題点を抱えているのが現状である。ヒトP450を導入した酵母を用いた発現系（例えば、Kovalevaら, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 221:129, 1996）では、P450の発現量はある程度得られ、P450 cDNAを改変せずに発現できることなどの利点はあるものの、系に酵母自身のP450が含まれる問題がある。大腸菌を用いる発現系（例えば、Gillamら, *Arch. Biochem. Biophys.*, 305:123, 1993）は取扱いが容易で大量に酵素を得ることができるもの、安定して発現させるためには発現させるP450のN-末端アミノ酸を改変する必要がある。また、この改変が酵素活性に影響を与える可能性が示唆されたり、大腸菌がP450活性を発揮するのに必要な還元酵素を持っていないため還元酵素を別に添加する必要があるなどの問題もある。昆虫細胞とバキュロウイルスを用いる系（例えば、Asseffaら, *Arch. Biochem. Biophys.*, 274:481, 1989）では発現量も多くN-末端アミノ酸の改変も必要ないが、発現のための操作に若干の熟練を要する。ヒト肝癌由来のHep G2細胞とワクシニアウイルスを用いる系（例えば、Shouら, *Mol. Carcinog.*, 10:159, 1994）やヒトBリンパ球を用いる系はヒトの細胞を用いることもあり、P450がより *in vivo* の環境に近い状態で発現していると考えられる。ただし、ワクシニアウイルスの使用を伴なう場合やHep G2細胞ミクロソームを用いる場合は、安全性に対する配慮が必要である（船江ら, *バイオサイエンスとインダストリー*, 55: 81, 1997）。

## 【0006】

また、薬物代謝酵素の生物学的役割と制御については未だに完全には解明されていない。これらの動物細胞、酵母、昆虫、細菌を用いる実験系は、*in vitro* での薬物代謝と化学発癌におけるP450の役割を検討するモデルとなりうるが、薬物動態のパラメーターなど他の要素のために、*in vivo* における状態を充分には反映していないことをふまえて使用しなくてはならない（Wolfら, *J. Pharm. Pharmacol.*, 50:567, 1998）。

## 【0007】

ヒトのP450遺伝子が導入され、体内でヒトと同じ代謝産物を生成する実験動物

ができれば、ヒトで特異的に生成する代謝産物であっても、その薬理作用はもとより毒性に関して動物を用いて検証できるなどの大きな利点があげられる(鎌滝ら, 薬物動態, 13:280, 1998)。そのため、P450遺伝子を導入したトランスジェニックマウスについての研究も行われている。例えばRamsdenらは、ラットCyp2B2遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製した。ラットCyp2B2遺伝子の発現は、組織特異的、発生特異的に制御されると共に、フェノバルビタールによって発現が誘導されることが知られている。トランスジェニックマウスにおける、フェノバルビタールによるトランスジーンの発現誘導には800bpのプロモーター配列だけでは不充分であり、さらに上流の遺伝子配列が必要であることが示された。また、トランスジーンの発現のコントロールには、転写開始点の数十キロベース上流の配列が必要であり、これによって発現量や組織特異性も再現できる可能性が示された (Ramsdenら, J. Biol. Chem., 268:21722, 1993)。

#### 【0008】

また、Liらは、ヒト胎児に特異的に発現するCYP3A7をもつトランスジェニックマウスを作製した (Liら, Archs. Biochem. Biophys., 329:235, 1996)。この例ではメタロチオネインプロモーターが使用され、P450遺伝子の組織特異的な誘導発現は観察されなかった。すなわち、作製された6系統のトランスジェニックマウスのうち1系統のみで、導入したCYP3A7遺伝子の肝臓での発現が認められたが、他の系統ではさまざまな臓器において発現が認められた。したがって、肝臓特異的にP450遺伝子を発現させるためにはメタロチオネインプロモーターでは不充分であると考えられる。

#### 【0009】

CYP3Aに関しては、胎児期の毒性研究のためのツールとしての応用についての研究も行われている (Kamatakiら, Toxicology Letters, 82-83:879, 1995)。Campbellらは、ラットCyp1A1遺伝子のプロモーターとその上流配列をlacZ遺伝子と結合した遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、それによりCyp1A1プロモーターによる遺伝子発現の制御について解析を進めた (Campbellら, J. Cell Sci., 109:2619, 1996)。これまでに、ヒトのP450遺伝子のひとつのサブファミリー (2~7個程度の遺伝子より成る) を、それらのP450遺伝子産物が代

謝する薬物により発現が誘導される形態で導入したトランスジェニック動物は報告されていない。

## 【0010】

トランスジェニックマウスに限らず、P450遺伝子のノックアウトマウスも開発

されており、発生や細胞レベルのホメオスタシスへの影響や *in vivo* での薬物あるいは化学物質を介した毒性に関する P450 の役割について解明する重要なツールとして期待されている (McKinnon ら, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 25:783, 1998)。例えば、内因性 Cyp1a2 のノックアウトマウスは 2 つの研究グループによって作製された。Pineau らによって作製された Cyp1a2 ノックアウトマウス (Pineau ら, *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 92:5134, 1995) は、ヘテロでは正常であるが、ホモであると生後すぐに死亡した。一方、Liang らによって作製された Cyp1a2 ノックアウトマウスは、ホモ個体の表現型に異常はなかった (Liang ら, *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 93:1671, 1996)。この違いは、欠損させる遺伝子の配列が異なることに起因しているものと考えられる。また、Cyp1a2 ノックアウトマウスを用いた P450 遺伝子の欠損の影響や代謝の異常についても報告 (例えば、Genter ら, *Biochem. Pharmacol.*, 55:1819, 1998) されており、このようなノックアウトマウスを用いた Cyp1a2 の代謝系での役割が解明されてきている。エタノールを代謝する主要な酵素として知られる Cyp2e1 についてもノックアウトマウスが作製された (Lee ら, *J. Biol. Chem.*, 271:12063, 1996)。Cyp2e1 はエタノール以外にも、アセトアミノフェンやアセトン、アラキドン酸の代謝に関与していることが知られているが、Cyp2e1 が完全に欠損したホモ個体であっても外見上はワイルドタイプのマウスと変わらなかったが、アセトアミノフェンに対する耐性が上がり、また、病理所見の結果などからアセトアミノフェンによる肝毒性に Cyp2e1 による代謝が大きく関与していることが示唆された。これらの P450 遺伝子ノックアウトマウスのいずれも、遺伝子ノックアウトによる当該遺伝子の機能解明を目的として作製されたものであり、導入される外来の P450 遺伝子の発現レベルの上昇を目的としたものではない。

## 【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記のような技術背景に基づき、in vivoで薬物の代謝を調べるための改良されたモデル動物、特にヒトP450遺伝子を保持し、ヒト型の薬物代謝を行うモデル動物を提供することを課題とする。

## 【0012】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者は、ヒト正常線維芽細胞由来7番染色体の部分断片をミクロセル法によりマウスES細胞（胚性幹細胞）に導入し、それを保持する株を得ることに成功した。また、このES細胞を用いて正常組織においてヒト染色体断片を保持し、薬剤の誘導によって肝臓、小腸においてヒトCYP3A4遺伝子を発現するキメラマウスを得た。さらに、マウス内在性P450遺伝子群を破壊するために、マウス5番染色体上のCyp3a遺伝子群に関する物理的 地図を作製するとともに、その物理的 地図をもとに遺伝子ターゲティングに必要なベクターを作製した。これにより、ヒトP450遺伝子（CYP3Aファミリー）を有し、さらにマウス内在性のP450遺伝子（Cyp3aファミリー）が破壊された、いわゆる遺伝子が置換されたマウスの作製を可能とした。かくして本発明を完成するに至った。

## 【0013】

本発明は以下のとおりである。

- (1) ヒトチトクロームP450遺伝子の少なくとも一つを保持し、同遺伝子は、同遺伝子産物の基質となる化合物により誘導発現されることを特徴とする非ヒト哺乳動物。
- (2) 前記ヒトチトクロームP450遺伝子がCYP3Aファミリーに属するものである(1)の非ヒト哺乳動物。
- (3) 前記ヒトチトクロームP450遺伝子は、同遺伝子を含むYACベクター又は同遺伝子を含む染色体断片を用いたミクロセル融合法により導入されたことを特徴とする(1)の非ヒト哺乳動物。
- (4) キメラ動物である(3)の非ヒト動物。
- (5) (4)の非ヒト動物と同種の野生型非ヒト動物と、(4)の非ヒト動物との交配により得られ、ヒトチトクロームP450遺伝子を含む染色体断片を保持する非ヒト動物。

(6) 前記ヒトチトクロームP450遺伝子のホモログである前記非ヒト哺乳動物固有のチトクロームP450遺伝子が破壊され、その固有の遺伝子の発現が低下又は消失した(1)の非ヒト哺乳動物。

(7) 前記非ヒト哺乳動物固有のチトクロームP450遺伝子の破壊が、Cre-loxPの系を用いて行われたものである(6)の非ヒト哺乳動物。

(8) マウスである(1)～(7)のいずれかの非ヒト哺乳動物。

(9) (1)～(8)のいずれかの非ヒト哺乳動物に由来し、ヒトチトクロームP450遺伝子が発現可能な細胞、又は同細胞を含む器官もしくは組織。

#### 【0014】

(10) マウスのCyp3a遺伝子群の染色体上の配置を決定するための物理的地図を作製する方法であって、下記の工程を含む方法：

(a) マウスCyp3a遺伝子の各々を特異的に検出できるPCRプライマーまたはハイブリダイゼーション用のプローブを用いたPCR又はハイブリダイゼーションにより、マウスBACライブラリーをスクリーニングする工程；

(b) 上記で選択されたBACクローンの末端塩基配列を決定し、同塩基配列に基づいてプライマー又はプローブを作製し、再度BACライブラリーをスクリーニングする操作を数回繰り返して、BACコンティグを作製する工程；及び

(c) 任意のマウスCyp3a遺伝子の全長cDNAプローブを作製し、同プローブを用いて上記BACコンティグに対して穏やかな条件でハイブリダイゼーションを行うことにより、Cyp3a遺伝子クラスターの両端を決定する工程。

(11) (10)の方法により作製でき、マウスCyp3a遺伝子群の染色体上の配置を明らかにした物理的地図。

(12) (11)の物理的地図に基づいてマウスCyp3a遺伝子クラスターの両端のそれぞれに相当するゲノムDNAをクローニングし、得られたクローン化断片のそれぞれを、バクテリオファージP1由来の組換え酵素Creの認識配列であるlox P配列を含むベクター中に挿入することを含む、マウスCyp3a遺伝子群欠損用ターゲティングベクターの作製法。

(13) (12)の方法により作製することができる一対のベクターであって、それぞれのベクターはマウス染色体に組み込まれ、前記酵素Creが存在すると

きのみにloxP配列間で相同組換えが起こり、Cyp3a遺伝子クラスター全体を欠失させることができることを特徴とする、マウスCyp3a遺伝子群欠損用ターゲティングベクター。

(14) (13) のベクターをマウスの分化多能性を保持する細胞に導入する工程と、酵素Creを発現させる工程を含む、マウス細胞のCyp3a遺伝子群を欠損させる方法。

(15) (14) の方法により作製することができるマウス細胞であって、Cyp3a遺伝子群を欠損し、かつ、分化多能性を保持する細胞。

(16) (15) のマウス細胞を分化させることを特徴とするCyp3a遺伝子を欠損したノックアウトマウスの作製方法。

(17) (16) の方法により作製されるCyp3a遺伝子群を欠損したキメラマウス又はその子孫。

(18) (17) のキメラマウス又はその子孫と、野生マウスとの交配により得られるCyp3a遺伝子群を欠損したマウス又はその子孫。

(19) (16) のキメラマウスもしくはその子孫又は(17)のマウスもしくはその子孫に由来する組織。

(20) (16) のキメラマウスもしくはその子孫又は(17)のマウスもしくはその子孫に由来する細胞。

(21) (8) のマウス又はその子孫を、(17)のキメラマウスもしくはその子孫または(18)のマウスもしくはその子孫と交配させることにより作製されたマウス又はその子孫であって、ヒトP450遺伝子群を含むヒト染色体を保持し、マウスCyp3a遺伝子群を欠損したマウス又はその子孫。

(22) (8) のマウスもしくはその子孫の個体、組織又は細胞を培養し、これらが保持するヒトチトクロームP450遺伝子を発現させることによって、生物学的に活性を有するヒトチトクロームP450を産生させ、同ヒトチトクロームP450を回収することを特徴とする、生物学的に活性を有するヒトチトクロームP450の製造方法。

(23) (21) のマウスもしくはその子孫の個体、組織又は細胞を培養し、これらが保持するヒトチトクロームP450遺伝子を発現させることによって、生物

学的に活性を有するヒトチトクロームP450を産生させ、同ヒトチトクロームP450を回収することを特徴とする、生物学的に活性を有するヒトチトクロームP450の製造方法。

(24) (8) のマウスもしくはその子孫又は(21)のマウスもしくはその子孫の個体、組織又は細胞に薬物を投与することを特徴とする前記薬物の薬理作用及び／または代謝を試験する方法。

以下、本明細書において、チトクロームP450を単に「P450」ということがある。

#### 【0015】

以下に、本発明の概要を説明する。

ヒトのP450遺伝子をマウスに導入し、*in vivo*で薬物の代謝を調べるために、導入した遺伝子の発現量や組織特異性、酵素誘導のパターンなどは本来その遺伝子がヒトにおいて機能するのと同じく再現される必要がある。導入遺伝子は、できる限り人為的な改変がされておらず、発現調節領域を含んだ大きな単位で導入することが求められる。マウスへの遺伝子導入法としては、これらの要求をみたすものであれば特に制限されない。YACベクターを用いる方法 (Jakobovitsら, *Nature*, 362:255, 1993など) を利用することができる。また、W097/07671に開示された、染色体断片をミクロセル融合によりマウスES細胞に導入してキメラマウスを作製する方法が用いられる。特に好ましいのは、より長大な領域の遺伝子を導入可能な後者の方法 (以下、該方法を本明細書では便宜上「ミクロセル融合法」と称する) である。その理由は以下のとおりである。

#### 【0016】

①一般に、P450分子種はファミリーごとにクラスターを形成していると考えられている (例えば、Grayら, *Genomics*, 28:328, 1995; Hoffmanら, *J. Mol. Evol.*, 41:894, 1995)。クラスターを形成している場合、それぞれの遺伝子が少なくとも部分的には共通した機能を有しており、それぞれの機能を互いに補完していることも予測され、単独の遺伝子を導入するよりも、クラスターごと導入することが望ましいと考えられる。ミクロセル融合法は、導入しうる遺伝子の長さにおいて有利である。

## 【0017】

② P450遺伝子の発現の調節はプロモーターのみならず、P450タンパクをコードする領域の遠位にあるシス作用因子 (cis-acting element) の影響を受けることが十分考えられる。前述のラットCyp2B2遺伝子を導入したトランスジェニックマウスでは、プロモーター上流19kbp内に含まれる配列が肝特異的なCyp2B2の発現に必要であることが示されており (Ramsdenら, J. Biol. Chem., 268:21722, 1993)、単に強力なプロモーターと連結したP450遺伝子を発現系に用いることが、生体に近い組織特異性や酵素誘導を再現する手段でないことは明白である。遺伝子がコードされる領域からなるべく遠位の領域まで含めてマウスに導入することにより、ヒトにおける発現調節がマウスにおいても再現されることが期待される。

## 【0018】

③また、前述のRamsdenらの報告では、作製された動物がトランスジェニックマウスであるため、導入した遺伝子が組込まれる位置によってその発現に影響がでたことも考えられる (Wolfら, J. Pharm. Pharmacol., 50:567, 1998)。ミクロセル融合法では、ヒト染色体をホストのゲノムに組み込むことなく独立した状態で細胞に導入できるため、このようなポジショナルエフェクトを回避できる可能性が考えられる。

## 【0019】

さらに、トランスジェニック動物を用いた薬物代謝に関するモデル動物は、その動物種のバックグラウンドの影響を受けない物であることが望ましい。例えば、ヒト特異的なP450遺伝子を導入した場合、マウスにおいて本来発現しているマウスのP450によって薬物の代謝様式や毒性の発現についてヒト型への変化が見られないことも有り得る (Wolfら, J. Pharm. Pharmacol., 50:567, 1998)。したがって、ヒトのP450遺伝子をマウスに導入するのであれば、マウス本来が持っているカウンターパートとなる遺伝子、すなわちP450遺伝子のマウスホモログがノックアウトされていることが望ましい。また、重要な遺伝子はその機能を失っても生体に重篤な影響が出ないようにその機能を補完する別の遺伝子が存在していると考えられる。このような遺伝子も併せて導入とノックアウトをマウスで行えば

、さらにヒトの状態に近くなるものと考えられる。

【0020】

本発明の具体的態様のひとつは、ヒトP450遺伝子ファミリーのうちCYP3A遺伝子群の非ヒト哺乳動物への導入に関する。ヒトの場合ではCYP1から4に属するP450が種々の薬物を含む外来性の異物の代謝に関与しているが、その中でもCYP3Aファミリーに属するCYP3A4はヒト肝ミクロソーム中の含量が最も多く、CYP3A4によって代謝される薬物の数は最も多く基質選択性が非常に広い（船江ら、バイオサイエンスとインダストリー、55：81、1997）。

【0021】

後記実施例に示すように、CYP3A遺伝子群を有するヒト7番染色体あるいはその断片を、W097/07671に記載の方法により導入したキメラマウスを作製した。さらに、好ましい実施態様においては、ヒトのCYP3A遺伝子群を効率良く発現させるため、且つヒト7番染色体上のCYP3A遺伝子群による薬物代謝をよりヒト型にするために、マウス内在性のCyp3a遺伝子群を破壊する。すなわち、ヒト遺伝子の導入を行ったマウスに対して、マウス遺伝子の破壊を行う。あるいはこの逆に、内在性のCyp3a遺伝子群を破壊したマウスにヒト遺伝子の導入を行うことも可能である。さらに、ヒト遺伝子の導入されたマウスとマウス遺伝子の破壊されたマウスの交配により所望のマウスを得ることもできる。

【0022】

マウス内在性Cyp3a遺伝子群は、マウス5番染色体上に、ヒトCYP3A遺伝子群と同様にクラスターを形成していると考えられている（例えば、D. R. Nelsonら、*Pharmacogenetics*, 6:1, 1996）。少なくとも現在までにCyp3a11, 13, 16（例えば、D. R. Nelsonら、*Pharmacogenetics*, 6:1-42, 1996）とCyp3a25（NCBIデータベースにcDNAの塩基配列のみが報告）の4つの遺伝子が同定されている。マウス内在性Cyp3a遺伝子群を完全に破壊するためには、少なくともこれら4遺伝子を破壊しなくてはならない。従来の遺伝子破壊（ノックアウト）法（例えば、Mansourら、*Nature*, 336:348, 1988）では、これら4遺伝子を個々に破壊しなければならず、少なくとも4回のノックアウト実験を行わなくてはならない。2つ以上の遺伝子を破壊する際に、それら標的遺伝子が物理的に十分離れて染色体上に存在し

ていれば、各々を破壊したノックアウトマウスを作製し、それらを交配させることによって複数遺伝子のノックアウトマウスを作製することが可能と考えられる（例えば、N. Longbergら、Nature, 368:856, 1994）。

## 【0023】

しかしながら、本発明においては、標的遺伝子であるCyp3a遺伝子群はクラスターを形成しているため、減数分裂の際に交叉による染色体の組換えが起こり得る程に、物理的に離れて存在しているとは考え難い。つまり、個々にノックアウトマウスを作製して交配するのではなく、同一のマウスES細胞（例えば、Evansら、Nature, 292:154, 1981）中で、少なくとも4回のノックアウト実験を行い、ノックアウトマウスを作製することが必要になる。さらに、破壊すべきCyp3a遺伝子はこれら4遺伝子で十分であるとは限らず、まだ未同定のCyp3a遺伝子が存在する可能性も考えられる。したがって、まず破壊すべきCyp3a遺伝子がいくつ存在するかを決定しなくてはならない。そして、その遺伝子の数だけ同一ES細胞中でノックアウトしなければならないことになる。

## 【0024】

ES細胞は全ての個体組織に分化する全能性を有する胚性未分化細胞であるが、当然ノックアウト実験によるクローニングの回数が増えれば増えるほど、その全能性が失われ、特に子孫伝達のための生殖細胞系列にES細胞が分化したような有用なキメラマウスが作製できなくなる危険性もある。これらのことから、従来法では本発明におけるマウス内在性Cyp3a遺伝子群の破壊は極めて困難であると考えられる。

## 【0025】

近年、バクテリオファージP1由来の組換え酵素Creとその認識配列である34merのloxP配列とを組み合わせた変異マウス作製システムが開発された。このシステムは、主に変異をコンディショナルに行うために用いられてきた（例えば、Gu. H.ら、Science, 265:103, 1994）。すなわち、ある遺伝子領域を欠失させたい際に、まずloxP配列を相同組換えにより、その遺伝子領域の両端に挿入し、Cre酵素を発現させたときのみにloxP配列間で組換えが起こり、その結果として標的遺伝子領域が欠失するというものである。このときにCre酵素遺伝子を発生時期特

異的な遺伝子プロモーター、あるいは組織特異的な遺伝子プロモーターの制御下におくことによって、標的遺伝子を発生のある特異的な時期や特異的な組織で欠失させることができる。さらに、loxP配列間での組換え効率が高いことを利用して、標的遺伝子領域を大きく欠失させることができる（例えば、Z-W. Liら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:6158, 1996）。通常の相同組換えによる遺伝子領域欠失は、その欠失領域が大きくなればなるほどその組換え頻度は低くなり、20 kb程度までの欠失が限界と考えられている。これに対して、Cre-loxPシステムを用いることによって、数百kb位の遺伝子領域の欠失が可能となりつつある。すなわち、一遺伝子のみならず、隣接した数遺伝子をまとめて欠失させることが可能と考えられる。

## 【0026】

そこで、本発明においては、前述したようにマウス内在性Cyp3a遺伝子群がクラスターを形成していることから、このクラスターの両端にloxP配列を挿入し、クラスターごと欠失させることを考えた。しかし、Cyp3a遺伝子クラスターがどれ位の大きさで、その両端がどのような遺伝子で構成されているかなどは全く未知であるため、このクラスターの物理地図作製を第一段階として行わなくてはならない。まず、既知のCyp3a11, 13, 16, 25を出発材料として、それらを含む巨大DNAをクローニングし、その両末端をプローブとして、さらに隣接した巨大DNAをクローニングするという、いわゆる染色体ウォーキング（例えば、I. B-Moreauら, Genomics, 46:183, 1997）を行い、連続した巨大DNAセット（コンティグ）を作製するという手順をとる。このコンティグ作製には巨大DNAのクローニングが必要であり、従来のシステムでは、大腸菌を宿主としたコスミドや酵母を宿主としたYAC (Yeast Artificial Chromosome) ベクターが用いられてきた。コスミドはそのクローニングキャパシティーが50 kb程度であり、このサイズで数百kbにわたるクラスターの物理地図を作製するには多大な労力を必要とする。

## 【0027】

一方、YACベクターは、最大2 Mbもの巨大DNAをクローニングすることができ、染色体レベルでの大まかな物理地図作製に専ら利用されてきた（例えば、S. W. Schererら, Hum. Mol. Genet., 2:751, 1993）。しかし、このようにクローニン

グキャパシティーが大きいことにより、クローニングの際に全く染色体上の位置が異なるゲノム断片同士がつながってベクターにクローニングされたり（いわゆるYACキメラ）、また、宿主である酵母中で培養している間にYACの一部が欠失したり、組換えが起こることがあり、YACはそれ程安定なわけではない。

## 【0028】

他方、近年、宿主中で安定で、クローニングサイズがコスミドとYACの中間であるBAC (Bacterial Artificial Chromosome) のシステムが開発された（例えば、H. Shizuyaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:8794, 1992）。宿主は大腸菌であり、菌体内でシングルコピーで存在しているF因子プラスミドを基に構築されている。クローニングサイズは最大で300 kb程度、平均で100-120 kbである。大腸菌内では、シングルコピーで存在し、非常に安定であり、ほとんど通常のプラスミドと同様に扱える。そのため、シークエンス解析を容易に行うことができ、世界的な規模で行われているヒトゲノムプロジェクトにおいて強力なツールとなっている。シークエンシングができるということは、BACクローンの末端シークエンスを基に末端プローブ (STSプライマー) を作製することができ、隣接したBACクローンのスクリーニングを容易に行うことが可能となることを意味する。これらの利点から、本発明におけるマウスCyp3a遺伝子クラスターの物理地図作製には、このBACシステムを用いることが好ましい。

## 【0029】

BACシステムを用いた具体的な物理地図作製法として以下の方法が考えられる。まず、Cyp3a11, 13, 16, 25を特異的に検出できるPCRプライマーあるいはハイブリダイゼーション用のプローブを作製し、マウスBACライブラリーをスクリーニングする。得られたBACクローンの末端シークエンスを行い、プライマーあるいはプローブを作製し、再度BACライブラリーをスクリーニングする。このスクリーニングを数回繰り返し、数百kbにわたるBACコンティグを作製する。最後にクラスターの両端を決定するために、任意のCyp3a遺伝子の全長cDNAプローブを作製し、得られたBACコンティグに対して、緩い条件（少なくともCyp 3a11, 13, 16, 25を含むBACクローンは陽性になる条件）でハイブリダイゼーションを行う。このプローブで陽性となるBACコンティグの内、最も外側に位置するBACクロー

ンがクラスターの両端に相当すると考えられる。この方法によって、クラスターの両端が決まってしまえば、そのクラスター内に未知のCyp3a遺伝子がいくつ存在しようとも、まとめて欠失させることができると考えられる。

## 【0030】

次に、BACシステムによるマウスCyp3a遺伝子クラスターの物理地図作製後、そのクラスターの両末端に相当するゲノムDNAをクローニングし、実際のターゲティングベクターを作製する。このベクター中には前述したようにloxP配列が含まれており、ES細胞中で相同組換えにより、クラスターの両末端に挿入できる。次にCre発現ベクターをそのES細胞にトランスフェクションすることによって、クラスターの両末端でCre-loxPシステムによる組換えが起こり、結果としてCyp3a遺伝子クラスターが欠失する。数百kbに及ぶと予想されるクラスターの欠失がCre-loxPシステムによって、どの位の効率で起こるかは予測できない。一般的には、欠失する遺伝子領域が大きければ大きいほど、組換え効率は低いと言われ（例えば、相沢慎一、実験医学別冊、ジーンターゲティング）、本発明における数百kbの欠失効率は決して高いとは期待できないと思われる。そこで、loxP間で組換えが起こった細胞を選択できるポジティブセレクション系を考えなければならぬ。

## 【0031】

近年、A. J. H. Smithら (Nature Genet., 9:376, 1995) はマウスES細胞中で、12番染色体と15番染色体とをCre-loxPシステムを用いて相互に転座させることに成功した。彼らはHprt（ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ）遺伝子欠損ES細胞に対して、Hprt遺伝子の5'側部分（loxPを含む）と3'側部分（loxPを含む）とをそれぞれ12番、15番染色体の特定領域に相同組換えにより挿入した。そして、Creを発現させ、loxP間で組換えが起こったときにのみHprt遺伝子が再構成され、そのES細胞はヒポキサンチンを含まない培地（HAT培地）でも増殖できるようになる。この選択法は、Hprt遺伝子欠損ES細胞に対してのみに用いることができ、いかなるES細胞に対しても利用できるわけではない。そこで、本発明においては、いかなるES細胞に対してでも利用できるように以下のような選択法を考えた。

## 【0032】

近年、動物細胞への遺伝子導入におけるレポータ遺伝子としてオワンクラゲ由来のGFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子が開発された (例えば、Prasher, D. Cら, Gene, 111:229, 1992)。GFPの発光には基質は必要でなく、蛍光で検出することが可能であるので、生細胞のまま、しかも短時間でモニターすることができる。このことは、ES細胞の全能性を保つという点においても重要であると考えられる。以上の点から、本発明においては、loxP組換え体のポジティブセレクションマーカーとして、GFP遺伝子を用いることとした。具体的には、プロモーターを含まないGFP遺伝子をCyp 3aクラスターの一端に挿入し、残りの一端にはGFPの発現に必要なプロモーターを挿入する。CreによるloxP配列間での組換えが起こると、プロモーターとGFP遺伝子とが連結され、GFPが発現するようになる。この組換えES細胞は蛍光を発光するので、セレクションが可能になる。

## 【0033】

得られたES細胞 (Cyp 3a遺伝子クラスターがヘテロに欠失) からキメラマウスを作製し、野生マウスと交配させ、Cyp3a遺伝子クラスターがヘテロに欠失したF1マウスを得る。一方、ヒト7番染色体断片を保持するキメラマウスと野生型マウスを交配させ、ヒト7番染色体断片を保持するF1マウスを得る。このF1マウスとCyp3a遺伝子クラスターがヘテロに欠失した上記F1マウスとを交配させ、Cyp3a遺伝子クラスターがヘテロに欠失し、かつヒト7番染色体断片を保持するF2マウスを得る。このF2マウスとCyp3a遺伝子クラスターがヘテロに欠失したF1マウスとを交配させることによって、最終的なマウス (マウスCyp3a遺伝子クラスターがホモに欠失し、かつヒト7番染色体断片を保持) が得られる。

## 【発明の実施の形態】

以下、本発明をさらに詳細に説明する。以下の実施の形態では、非ヒト哺乳動物としてマウスについて説明するが、本発明はマウスに限定されるものではない。

ヒトP450遺伝子群を含むヒト染色体またはその断片を、自己の染色体上に発現可能な形態で保持し、さらにカウンターパートであるマウス内在性P450遺伝子群を欠損したマウス個体は、

(1) 標識されたヒトP450遺伝子を含む染色体またはその断片を保持する染色体供与細胞の作製、

(2) 分化多能性を保持するマウス細胞へのミクロセル法によるヒト染色体またはその断片の移入、

(3) 上記マウス細胞を用いたキメラマウスの作製、

(4) キメラマウスにおけるヒトP450遺伝子群を含むヒト染色体の保持および、ヒトP450遺伝子の発現の確認、

(5) マウス内在性P450遺伝子群の物理的 地図の作製、

(6) 上記物理的 地図をもとにしたノックアウトベクターの作製、

(7) 分化多能性を保持するマウス細胞における遺伝子ターゲティング、

(8) 上記マウス細胞を用いたノックアウトマウスの作製、

(9) ノックアウトマウスにおけるマウスP450遺伝子群の欠損の確認、及び

(10) ヒトP450遺伝子群を含むヒト染色体を保持するマウスと、マウス内在性P450遺伝子群を欠くマウスの交配、  
の経過を経ることにより得ることができる。

## 【0034】

このような過程を経て、ヒトP450遺伝子又はP450遺伝子群が導入されたマウス、あるいは、さらに、マウス内在性P450遺伝子群を欠失したマウスを、「ヒトP450遺伝子導入マウス」ということがある。

## 【0035】

以下、ヒトP450遺伝子導入マウスの作製法の例を、各工程毎に詳述する。

(1) 標識されたヒトP450遺伝子を含む染色体またはその断片を保持する染色体供与細胞の作製

染色体供与細胞としては、1) 受容細胞で選択可能なマーカーで標識されたヒト染色体を保持し、2) それ以外のヒト染色体を含まない、3) ミクロセル形成能が高い細胞が望ましい。

## 【0036】

ヒト染色体提供の材料としては、ヒト由来のあらゆる細胞株、癌細胞、初代培養細胞を用いることができるが、染色体の欠失、増幅等の異常の可能性が低く、

また培養が容易な点を考慮すると正常線維芽細胞が適している。

【0037】

まず、1)については、ヒト細胞は、薬剤（G418、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、ブластトサイジン）耐性等のマーカー遺伝子を発現するベクターにより形質転換することができる。ここで用いるマーカー発現制御のためのプロモーターとしては、ヒト細胞においてのみならず、マウスES細胞のような受容細胞で効率よく働くものが望ましい。この目的には、SV40エンハンサーと単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーターを連結したものの（Katohら、Cell Struct. Funct., 12:575, 1987）、マウスPGK-1プロモーター（Sorianoら、Cell, 64: 693, 1991）等を用いることができる。

【0038】

上記マーカー遺伝子、必要に応じてプロモーターを連結したマーカー遺伝子を含むDNA断片で、エレクトロポーレーション（石田ら、細胞工学実験操作入門、講談社、1992）等によりヒト細胞を形質転換し、マーカー遺伝子が発現する細胞を選択することにより、導入されたマーカー遺伝子が、23種46本あるヒト染色体上にランダムに挿入されたようなヒト細胞形質転換体のライブラリーを得ることができる。

【0039】

3)については、多くのヒト正常細胞はミクロセル形成能が非常に低いので、上記の形質転換体をミクロセル形成能の高い細胞、例えば、マウスA9細胞（Oshima, M., Environ. Health Perspect., 93:57, 1991）と全細胞融合することにより、ミクロセル形成能を付与することができる。マウス-ヒト雑種細胞では、ヒト染色体が選択的に消失することが知られているが、ここで得られた融合株は、先述のマーカーで選択することにより、マーキングされたヒト染色体を安定に保持することができる。

【0040】

さらに、2)の条件を満たすために、この細胞融合株からミクロセルを取得し、マウスA9細胞と再度融合することが望ましい。この場合もヒト染色体上のマーカーで選択することにより、得られるミクロセル融合株の多くは1)、2)、3)

の条件を満たしたものであると考えられる。マーキングされたヒト染色体の同定は、最終段階で得られるマウス-ヒトモノクロソーム雑種細胞においてPCR（ボリメラーゼチェインリアクション、Sakakiら、*Science*, 239:487, 1988）、サザンプロット解析（Ausubelら、*Current protocols in molecular biology*, John Wiley & Sons, Inc., 1994）、FISH（フルオレッセンス・インサイチュ・ハイブリダイゼーション、Lawrenceら、*Cell*, 52:51, 1988）解析等により調べができる。

#### 【0041】

ヒトP450遺伝子を含む染色体の導入を行う場合には、多くのヒト細胞形質転換体クローンについて、それぞれ上記の過程を繰り返して目的染色体がマーキングされたものを探す。あるいは、ヒト細胞形質転換クローンの混合物について上記の過程を実施し、得られる多数のマウス-ヒトモノクロソーム雑種細胞についてヒトP450遺伝子を含む染色体の同定を行ってもよい。さらに、ヒトP450遺伝子を含む染色体上のDNA配列を標的とした相同組換え（Thomasら、*Cell*, 51:503, 1987）により、特定の部位にマーカー遺伝子を挿入することも可能である。

#### 【0042】

マウス-ヒト雑種細胞から調製したミクロセルにガンマ線を照射することにより、マーキングされたヒトP450遺伝子を含む染色体を断片化して、マウスA9細胞に導入することもできる。また、ミクロセルにガンマ線を照射しない場合でも、ある割合で部分断片化したヒトP450遺伝子を含む染色体が移入されることがある。これらの場合、得られるミクロセル融合株は、マーキングされたヒトP450遺伝子を含む染色体の部分断片を保持している。これらは、受容細胞にヒトP450遺伝子を含む染色体の部分断片を導入したいときに用いることができる。

#### 【0043】

マウスES細胞等の受容細胞に導入されるヒト染色体には、目的とするチトクロームP450遺伝子の導入が可能である限り、欠失、転座、置換、逆位、倍加などの様々な改変を施し得る。従来は、富塚ら（*Nature Genet.*, 16:133-143, 1997）が作製したヒト抗体産生マウスのように、偶発的に断片化したヒト染色体断片やヒト染色体全長そのものがマウスへの導入に使われていた。このように、偶発的

に断片化したヒト染色体断片やヒト染色体全長を用いる場合、導入されるヒト染色体によっては、マウス中で不安定であったり、あるいは、ヒト染色体上の遺伝子がマウスの発生に影響を及ぼし、ヒト染色体導入マウス自体が生まれてこないといった問題に直面する可能性も考えられる。したがって、あらゆるヒト染色体断片を安定に保持するようなマウスを将来的に作製していくためには、偶発的に生じた染色体断片ではなく、目的に適うようにヒト染色体を所望の部位で切断したり、所望の染色体断片のみを別の安定な染色体につなげるなどといった自由自在に染色体を加工する技術が望まれる。このような技術は、染色体工学と呼ばれ、主にマウスES細胞中で内在性マウス染色体を部位特異的に切断したり (WO 98/54348) 、相同染色体間で組換え（転座）を起こさせることで特定の遺伝子領域を欠失・逆位・倍加させ、そのような改変染色体を有する変異マウスの作製に利用されてきた (R.Ramirez-Solisら、Nature 378:720, 1995)。一方、このような様々な人工的改変を施されたヒト染色体を保持するマウスなどの非ヒト動物の作製は報告がない。

#### 【0044】

そこで、本発明において、ヒト7番染色体上のCYP3A遺伝子群をマウス中で安定かつ効率良く発現させるために、ヒト7番染色体断片を保持するヒト人工染色体（以下、「#7-HAC」と呼ぶ）の構築を開示する。この#7-HACの構築は、例えば、以下に示す過程によって実施され得る（図12参照）。

#### 【0045】

##### (i) ヒト7番染色体の改変

ヒトCYP3A遺伝子クラスターは、7番染色体上の7q21-22に存在する（例えば、B.A.Brooksら、Am.J.Hum.Genet., 43:280, 1988）。この染色体領域周辺のみを人工染色体作製に用いるために、まず、CYP3A遺伝子クラスターの極テロメア側に位置する染色体部位（例えば、ARC41など）にヒトテロメア配列を相同組換えにより挿入し、テロメアトランケーション（例えば、黒岩ら、Nucleic Acid Research 26:3447, 1998）することで切断する。

#### 【0046】

ところで、CYP3A遺伝子クラスターの極セントロメア側にMDR遺伝子クラスター

(PGY1, 3) が存在する (NCBIデータベース)。MDR1遺伝子は薬物の細胞外排出に関わる遺伝子 (例えば, Juliano, R.L. ら、 *Biochemi. Biophys. Acta.* 455:152, 1976) であり、特定の薬物に対して種差があることが報告されている (例えば, Lecureur V. ら、 *Carcinogenesis*, 17:1157, 1996)。CYP3A4の基質の大部分が MDR1の基質でもあるため (例えば、 Schuetz, E.G. ら、 *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 93:4001, 1996)、ヒト型薬物代謝モデル動物作製において、ヒトCYP3A遺伝子クラスターに加えてMDR遺伝子クラスターも併せて導入することがより有用であると考えられる。そこで、好ましい態様においては、MDR遺伝子クラスターの極セントロメア側に位置する染色体部位 (例えば、 AC004082 NCBIデータベース) に組換え酵素Creの認識配列であるloxP配列を相同組換えにより挿入し、MDR-CYP3A断片のみを人工染色体作製に用いる。また、P450遺伝子と同様、MDR遺伝子においても宿主動物側の相同遺伝子が欠損あるいは不活性化されていることが望ましい。マウスにおいてはMdr1aおよびMdr1b遺伝子ノックアウトの事例が報告されており (Schinkel ら、 *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 94:4028, 1997; Schinkel ら、 *Cel* 1, 77:491, 1994)、これらの論文に記載された方法に従ってMdr遺伝子欠損マウスを作製しうる。Mdr遺伝子欠損マウスを前述の交配計画に組み込むことにより、マウスCyp3a遺伝子クラスターと、マウスMdr1aおよび/またはMdr1b遺伝子がホモに欠失し、かつヒトCYP3A遺伝子クラスターとヒトMDR遺伝子クラスターを含む染色体断片を保持するマウスが得られる。

## 【0047】

## (ii)ヒト14番染色体断片SC20の改変

富塚ら (Nature Genet., 16:133-143, 1997) の作製したヒト抗体産生マウスにおいて、ヒト14番染色体断片SC20は、マウス中においてほぼ100%保持され、かつ子孫伝達することが示されている (W098/37757)。そこで、本発明において、このSC20をヒト人工染色体ベクターとして用いることを考える。つまり、上記(i)で記したMDR-CYP3Aヒト7番染色体断片をSC20へ転座させることでヒト7番染色体断片を保持するヒト人工染色体#7-HACを構築する。14番染色体上の14p12に位置するRNR2遺伝子座にloxP配列を相同組換えにより挿入し、Cre-1 xPシステム (例えば、 R.Ramirez-Solis ら、 *Nature*, 378:720, 1995) を用いることで、MD

R-CYP3Aヒト7番染色体断片をSC20上のRNR2遺伝子座に転座させる。

【0048】

上記(i)、(ii)で記した相同組換えを効率良く行うためのホスト細胞として、  
トリDT40細胞を利用することができる（例えば、Diekenら、Nature Genet.,  
12:174, 1996）。以下、DT40細胞を用いる例について説明するが、ES細胞でも  
効率はDT40細胞に比べて低いが、相同組換えは可能である。

【0049】

(iii)Cre-loxPシステムによるMDR-CYP3Aヒト7番染色体断片のSC20上への転座  
上記(i)、(ii)に示すようにして得られた改変ヒト7番染色体断片と改変SC20  
のそれぞれを保持するDT40細胞を作製する。次に、Cre-loxPシステムを用いてMD  
R-CYP3Aヒト7番染色体断片をSC20上へ転座させるために、それぞれの改変ヒト  
染色体断片を保持するDT40細胞を融合させることによって、2本の改変ヒト染色  
体断片を保持するDT40細胞ハイブリッドを作製する。これで、転座のための材料  
が揃うことになる。

【0050】

次に、Cre組換え酵素をこのDT40細胞ハイブリッド中で発現させて転座させる  
わけであるが、2本の非相同染色体間での組換え（転座）頻度は非常に低いこと  
が報告されており（例えば、A.J.Smithら、Nature Genet., 9:376, 1995）、さ  
らに本発明の場合は、内在性染色体間ではなく、外来性のヒト染色体間での転座  
であるため、さらに組換え効率が低くなる可能性も考えられる。そこで、期待通り  
loxP間で組換えが起こった細胞を選択できるポジティブセレクション系を考え  
ることが好ましい。そこで、本発明の好ましい態様においては、内在性マウスCy  
p3a遺伝子クラスターの欠失の項でも述べたように、loxP間で染色体の転座が起  
こった細胞においてGFP遺伝子が発現し、FACSでソーティングすることによって  
目的の細胞をクローニングするシステムを用いる。さらに、組換え頻度を上げる  
ために、Cre組換え酵素を一過性ではなく、安定発現させる。2本の染色体間で  
の転座は相互的に起こるので、Cre組換え酵素を安定発現させると、せっかく転  
座を起こした染色体が、頻度こそは低いが、再び組換え（転座）を起こして元に  
戻ってしまう可能性がある。そこで、通常このような実験においてはCre組換え

酵素を一過性に発現させたり、Cre組換え酵素の発現を厳密にコントロールしたりする。しかし、本発明においては、DT40ハイブリッド中で転座させた直後に目的的転座したヒト人工染色体をミクロセル融合法によりチャイニーズハムスターCHO細胞へ移入させるため、CHO細胞においては、Cre組換え酵素の影響は受けず、に済む。そこで、単純にCre組換え酵素を安定発現させることが可能となる。

## 【0051】

上記(i)、(ii)、(iii)で開示したように、トリDT40細胞中でテロメアトランケーションとCre-loxPシステムによる染色体間転座を用いることによって、如何なるサイズのヒト染色体断片（YACベクターのクローニングサイズを越える）をも安定なSC20染色体ベクター上のloxP部位（14p12）にクローニングすることができ、ヒト人工染色体構築システムが提案される。

## 【0052】

上記のヒト人工染色体構築システムにより作製された#7-HACは、マウスES細胞に導入される前に、チャイニーズハムスターCHO細胞に導入されるべきである。Diekenら（Nature Genet., 12:174, 1996）は、改変ヒト染色体をトリDT40細胞からマウスMEL細胞（ガン細胞の一種）へ移入したが、大部分が断片化された状態で移入された。本発明者らも、トリDT40細胞からマウスA9細胞などへヒト染色体の移入を試みたが、全てヒト染色体の断片化が観察され、無傷の状態で移入されることはなかった。しかしながら、チャイニーズハムスターCHO細胞へ移入した際にのみ、無傷の状態でヒト染色体を移入し得ることを発明者らは初めて見出した。そこで、後記実施例では、ヒト人工染色体構築システムにより作製された#7-HACは一度CHO細胞へ移入することとした。CHO細胞はマウスA9細胞と同様に効率良くミクロセルを形成することが知られており（例えば、M.Koiら、SCIENCE 260:361, 1993）、これにより改変ヒト染色体をCHO細胞からマウスES細胞へ移入し、#7-HAC保持キメラマウスを作製することができると考えられる。以上の手順の概略を、図16に示す。

## 【0053】

(2) 分化多能性を保持するマウス細胞へのヒトP450遺伝子を含む染色体またはその断片の移入

これまでに、種々の系統のマウス由来の胚性癌腫細胞（EC細胞、Hanaokaら、Differentiation, 48:83, 1991）、胚性幹細胞（ES細胞、Evansら、Nature, 292: 154, 1981）、胚性生殖細胞（EG細胞、Matsuiら、Cell, 70:841, 1992）を、マウス初期胚に注入あるいはマウス初期胚と共に培養することにより、未分化な状態の前記の種々の細胞が分化して様々な形態あるいは機能を有する体細胞に変化（分化）すること、すなわちキメラマウス作製が可能であることが報告されている。ES、EG細胞はその能力が特に高く、多くの場合生殖細胞にも寄与し、その細胞由来の子孫を作ることができる。EC細胞は主に生殖細胞癌から、ES細胞は胚盤胞の内部細胞塊から、EG細胞は発生初期に出現する原始生殖細胞から得られる。本発明におけるヒトP450遺伝子を含む染色体移入の受容細胞としては、これらの細胞株およびその変異株、さらにはマウス個体において全てのあるいは一部の正常体細胞に分化可能なあらゆる未分化細胞を用いることができる。

#### 【0054】

受容細胞へのヒト染色体移入の材料としては、（1）で得られたヒトP450遺伝子を含む染色体供与細胞から調製されるミクロセルあるいはガンマ線照射したミクロセルを用いることができる。受容細胞への移入は、（清水素行、細胞工学ハンドブック、羊土社、1992）等に記載された方法で受容細胞とミクロセルを融合することにより行う。ミクロセル供与細胞においては、ヒトP450遺伝子を含む染色体またはその断片が受容細胞において選別可能なマーカーを保持している。この中から、（1）と同様にPCR、サザンプロット解析、FISH解析等により、ヒトP450遺伝子あるいはヒトP450遺伝子を含む染色体あるいはその断片を保持する株を選択すれば、ヒトP450遺伝子を含む染色体あるいはその断片を導入することが可能である。また、異なる選択マーカーを保持する複数のヒトP450遺伝子を含む染色体あるいはその断片を逐次導入することにより、これらを同時に保持する受容細胞を得ることもできる。

#### 【0055】

ヒトP450遺伝子を含む染色体上のマーカー（G418耐性等）により選抜された受容細胞が、供与細胞の保持していたヒトP450遺伝子を含む染色体あるいはヒトP450遺伝子の全部あるいは一部を保持していることは、以下のようにして確認され

る。選抜された受容細胞から抽出したゲノムDNAを用い、プローブとしてヒト特異的繰り返し配列 (L1、Alu等、Korenbergら, Cell, 53:391, 1988)、ヒト染色体特的プローブ (Lichterら, Human Genetics, 80:224, 1988) を用いたフルオレッセンス・インサイチュ・ハイブリダイゼーション (FISH) 等の染色体解析、ヒトP450遺伝子特異的プライマーによるPCR法、ヒトP450遺伝子特異的配列プローブを用いたサザン解析により検出される。

#### 【0056】

(3) ヒトP450遺伝子を含む染色体導入マウス細胞からのキメラマウス作製

(2)で得られたES細胞株等のマウス細胞株からのキメラマウス作製は、(相澤慎一, バイオマニュアルシリーズ8ジーンターゲティング, 羊土社, 1995) 等に記載された方法で行う。効率的なキメラマウス作製を行うための宿主胚の発生時期、系統等の選択については、それぞれのES細胞株についてすでに検討された条件を用いることが望ましい。例えば、CBA×C57BL/6 F1由来のTT2細胞 (野生色、Yagiら, Analytical Biochemistry, 214:70, 1993) についてはBalb/c (白色、日本クレア社) あるいはICR (日本クレア社) 由来の8細胞期胚を宿主胚として用いることが望ましい。

#### 【0057】

(4) キメラマウスにおけるヒトP450遺伝子群を含む染色体の保持およびヒト遺伝子発現の確認

ES細胞を注入した胚から誕生したマウスにおけるES細胞の貢献率は、その毛色によりおおまかな判定ができる。しかし、毛色に貢献がみられないからといって他の組織で貢献がないと判断はできない。より詳細なキメラマウス各組織におけるヒト染色体の保持は、各組織より抽出されたゲノムDNAを用いたサザン解析、PCR等によって確認することができる。

#### 【0058】

導入された染色体上のヒトP450遺伝子の発現は以下のようにして確認される。ヒトP450遺伝子を含む染色体由来のmRNAの発現は、各組織由来のRNAを用いたRT-PCR法 (Kawasakiら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5698, 1988)、ノーザンプロット法 (Ausubelら, 前記) により検出される。タンパク質レベルの発現

はウェスタンプロット法 (Ausubelら, 前記) あるいは、キメラマウス肝ミクロソームを用いたテストステロン6 $\beta$ 水酸化活性測定等により検出される。さらに、キメラマウス細胞中でのヒトP450遺伝子群を含む染色体の保持および該染色体上の遺伝子の発現が、キメラマウス由来初代培養細胞での薬剤耐性マーカー遺伝子発現による耐性細胞の出現により確認できる。

## 【0059】

キメラマウスにおいてヒトP450遺伝子群を含む染色体を保持するES細胞が、そのキメラマウスの生殖細胞に分化した場合、その子孫にも導入したヒトP450遺伝子群を含む染色体またはその断片が認められ、その染色体または断片上の遺伝子を発現する。

## 【0060】

## (5) マウス内在性P450遺伝子群の物理的 地図の作製

導入したヒトP450遺伝子群のカウンターパートとなるマウス内在性P450遺伝子群 (Cyp3aクラスター) を欠損させたマウスを作製するためには、クラスター内の各Cyp3a遺伝子の配列順序、すなわち、物理的 地図を決定する必要がある。このような物理的 地図の作製には、プラスミドのようなクローニングサイズが小さいものは不適切で、巨大なDNAをクローニングできるシステムが必要不可欠である。このような目的のために、従来までは、クローニングサイズが40 kb位のコスミドや最大2 MbまでのDNAをクローニングできる酵母人工染色体であるYAC (例えば、S. W. Schererら, *Human Molecular Genetics*, 2:751, 1993) ベクターを用いた物理的 地図の作製が行われてきた。コスミドベクターを用いることによって、そのクローニングサイズの小ささから精度の高い地図を作製することが可能である。一方、YACベクターを用いることで、染色体レベルでの広範囲にわたる大まかな地図を作製することが可能である。あるいは、最近、この両者の中間のクローニングサイズ (100-300 kb) を持つバクテリア人工染色体BAC (H. Shizuyaら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:8794, 1992) ベクターが開発されたが、これを用いることも可能である。BACベクターは挿入DNAの末端シークエンスが容易にできるという点で、染色体ウォーキングやゲノムの大規模シークエンスなどに威力を発揮している。これらのベクターシステムを利用することで、染色体上の

マウス内在性Cyp3aクラスターの物理的 地図を作製することができる。

【0061】

例えば、BACベクターを用いた物理的 地図の作製は以下のようにしてできる。

マウスCyp3a遺伝子の各々 (Cyp3a11, 13, 16と25) を特異的に検出できるPCRフ

ライマーあるいはハイブリダイゼーション用のプローブを作製し、市販のマウス BACライブラリーをスクリーニングすることができる。得られたBACクローンの末端シークエンスを行い、プライマーあるいはプローブを作製し、再度BACライブラリーをスクリーニングする。この末端シークエンス及びスクリーニングを数回繰り返すことによって、数百kbにわたるBACコンティグを作製できる。最後にクラスターの両端を決定するために、任意のマウスCyp3a遺伝子の全長cDNAプローブを作製し、得られたBACコンティグに対して、緩い条件でハイブリダイゼーションを行う。この条件は、少なくとも現在までに同定されているCyp3a11, 13, 16と25の4遺伝子のいずれかを含むBACクローンはすべて陽性になることが望ましい。このプローブで陽性となるBACクローンの内、最もコンティグの外側に位置するクローンがクラスターの両末端に相当することになり、クラスターの物理的 地図を完成させることが可能となる。あるいは、ゲノムプロジェクトで行われているように、このBACコンティグの全シークエンスを決定することによっても達成することができる。

【0062】

(6) 上記物理的 地図をもとにしたターゲティングベクターの作製

BACシステムによるマウスCyp3a遺伝子クラスターの物理地図作製後、そのクラスターの両末端に相当するゲノムDNAをクローニングし、実際のターゲティングベクターを作製することが可能である。このベクター中には、前述したように loxP配列が含まれており、ES細胞中で相同組換えにより、クラスターの両末端に挿入できる。次に、Cre発現ベクターをそのES細胞にトランスフェクションすることによって、クラスターの両末端でCre-loxPシステムによる組換えが起こり、結果としてCyp3a遺伝子クラスターを欠失させることができる。

【0063】

同様なシステムとして、酵母のFLP/FRTシステム（例えば、S. Jungら、Scienc

e, 259:984, 1993) を利用することもできる。数百kbに及ぶと予想されるクラスターをCre-loxPシステムによって欠失させる場合、その欠失がどの位の効率で起こるかは予測できない。そこで、loxP間で組換えが起こった細胞を選択できるポジティブセレクション系として、例えば、GFP遺伝子の発現をマーカーとすることができる。具体的には、プロモーターを含まないGFP遺伝子をCyp3aクラスターの一端に挿入し、残りの一端にはGFPの発現に必要なプロモーターを挿入する。CreによるloxP配列間での組換えが起こると、プロモーターとGFP遺伝子とが連結され、GFPが発現されるようになる。このような組換えES細胞は蛍光を発光するので、セレクションが可能になる。

#### 【0064】

他のセレクションマーカーとして、ある種の薬剤耐性遺伝子を用いることも可能である。この場合、Cre-loxP組換えの結果、薬剤耐性遺伝子が発現し、その薬剤を含んだ選択培地中で組換えES細胞をセレクションすることができる。いずれにせよ、セレクション法としてES細胞の全能性になるべく影響を与えないものが望ましい。

#### 【0065】

##### (7) 分化多能性を保持するマウス細胞における遺伝子ターゲティング

分化多能性を保持するマウス細胞、例えば、ES細胞に(6)で作製されたターゲティングベクターを導入する。その際、エレクトロポレーションなどの、ES細胞に遺伝子を導入するために確立された(相澤慎一、バイオマニュアルシリーズ8ジーンターゲティング、羊土社、1995)等に記載された条件で行うのが望ましい。先述のように、クラスターごと遺伝子を欠損させるためにCre-loxPシステムを利用するのであれば、クラスターの上流と下流にloxP配列を導入することに、PCR、サザン解析などで、相同組換えが起こっていることを確認するとともに、ES細胞が分化多能性を有しているか確認することが望ましい。すなわち、それぞれのベクターを導入し相同組換えによって得られたloxP配列をゲノム内に持つESクローンを用いてキメラマウスを作製し、その作製効率を検討する。Cre酵素を発現するベクターについても同様に、マウス内在性Cyp3a遺伝子のクラスターの両端にloxP配列を保持するES細胞へエレクトロポレーションなどにより導入を行う

【0066】

Creはマウスゲノム内に必ずしも組込まれる必要はなく、一時的に発現するようなプロモーターあるいはベクター構造でもよい。最終的にCyp3a遺伝子がクラスターとして欠損したES細胞のセレクションには、PCR、サザン解析といった、遺伝子を直接的に解析する方法だけでなく、GFPなどのレポーター遺伝子を用いたセレクションを併用すると便利である。

【0067】

(8)上記マウス細胞を用いたノックアウトマウスの作製

ノックアウトマウスの作製については先述の(3)の方法と同様である。

【0068】

(9)ノックアウトマウスにおけるマウスP450遺伝子群の欠損の確認

作製されたノックアウトマウスにおけるES細胞の貢献率は、ヒト染色体導入キメラマウスと同様にその毛色によっておおよその判断ができる。さらに、ノックアウトマウスより抽出したゲノムDNAを用いたサザン解析、PCR等により内在性遺伝子の欠損を確認することが望ましい。また、ターゲティング部分にGFPを挿入した場合は、マウス個体においても発現が認められるため、ES細胞におけるセレクションと同様に、蛍光によって、容易にノックアウトマウスの選別が可能となる。

【0069】

(10)ヒトP450遺伝子群を含むヒト染色体を保持し、マウス内在性P450遺伝子群を欠くマウスの作製

ヒトP450遺伝子群を含むヒト染色体を保持し、マウス内在性P450遺伝子群を欠くヒトP450マウスは、先述の方法によって作製された、ヒトP450遺伝子群を含むヒト染色体を保持するキメラマウスあるいはその子孫と、内在性マウスP450遺伝子をクラスターごと欠損させたキメラマウスあるいはその子孫を交配することにより得られる。「ヒト染色体の保持」、「内在性P450遺伝子の欠損」は共に、基本的にメンデルの法則に従って両者の遺伝的要素が伝達すると考えられる。マウスの交配方法には種々のパターンが考えられるが、具体的には以下のように実

施可能である。まず、Cyp3a遺伝子クラスターがヘテロに欠失したキメラマウスを野生マウスと交配させ、Cyp3a遺伝子クラスターがヘテロに欠失したF1マウスを得る（F1マウスA）。一方、ヒト7番染色体断片を保持するキメラマウスと野生型マウスを交配させ、ヒト7番染色体断片を保持するF1マウスを得る（F1マウスB）。F1マウスAとF1マウスBを交配させ、Cyp3a遺伝子クラスターがヘテロに欠失し、かつヒト7番染色体断片を保持するF2マウスを得る。このF2マウスとF1マウスAとを交配させることによって、最終的なマウス（マウスCyp3a遺伝子クラスターがホモに欠失し、かつヒト7番染色体断片を保持）が得られる。

また、マウス内在性P450遺伝子欠損マウスは、ホモ個体を作製し、これを用いるよりも、ヘテロ個体を交配のために用いる方が良い。なぜなら、ノックアウトマウスにおける遺伝子欠損ホモ個体は、しばしば致死性であることが報告されており、胎児期、新生時期に死亡してしまう可能性が考えられるためである。

#### 【0070】

上記のようにして得られるキメラマウスを利用して生物学的に活性のあるヒトP450タンパクをその器官、組織、細胞から得ることができる。例えば、キメラマウスあるいはその子孫の肝ミクロソームからヒトP450を含む分画を抽出し、精製することでヒトのP450タンパクを抽出できる。あるいは、ヒトP450遺伝子を含む染色体を保持するキメラマウスあるいはその子孫の組織から細胞株を樹立し、培養することでその培養物からヒトP450タンパクを回収することが可能である。また、得られたキメラマウスあるいはその子孫あるいはそれとマウス内在性P450遺伝子群を欠損させたノックアウトマウスとを交配させてできたヒトP450導入マウスは、その体内で本来ヒトの生体内で発現しているのと同じパターンでヒトP450を発現していると考えられるため、特定の薬物を投与することで個体レベルでの薬理効果、毒性、薬物動態を研究するための実験動物としての利用価値が高い。さらに、ヒトにおける薬物の代謝メカニズムや組織ごとの毒性について、薬物をヒトに投与することなく知ることができる。

#### 【0071】

##### 【実施例】

以下に実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実

施例に限定されるものではない。

【0072】

【実施例1】ヒト7番染色体断片を保持するマウスA9細胞のスクリーニング

(1) ヒト染色体を保持するマウスA9細胞ライブラリーの作製

様々なヒト染色体を保持するマウスA9細胞ライブラリーを、W097/07671に記載の方法に従って調製した。具体的には以下に示すようにして行った。

G418耐性遺伝子を含むプラスミドpSTneoB (Katohら、Cell Struct. Funct., 12:575, 1987; Japanese Collection of Research Biologicals (JCRB), Deposit Number: VE039) を制限酵素SalI (宝酒造) で線状化し、ヒト正常纖維芽細胞HFL-1 (RIKEN Cell Bankより入手、RCB0251) へ導入した。HFL-1細胞をトリプシン処理し、 $5 \times 10^6$  個/mlとなるようにダルベッコのリン酸バッファー (PBS) に懸濁

してから10  $\mu$ g DNA存在下でジーンパルサー (バイオラッド) を用いてエレクトロポレーションを行なった (石田ら、細胞工学実験操作入門、講談社, 1992)。25  $\mu$  Fの容量で1000Vの電圧を4mm長のエレクトロポレーションセル (165-2088、バイオラッド) を用いて室温で印加した。エレクトロポレーションした細胞を15%牛胎児血清 (FBS) を添加したイーグルF12培地 (以下F12、という) を含む100mm組織培養用プラスチックシャーレ (コーニング) 3~6枚に播種した。1日後に200  $\mu$ g/mlのG418 (GENETICIN, シグマ) を含む15% FBSを添加したF12培地と置き換えた。2~3週間後に生じたコロニー100個程度を一つの集団として52グループにそれぞれまとめ、100mmシャーレに再び播種し培養した。

【0073】

マウスA9細胞 (Oshimura, Environ. Health Perspect., 93:57, 1991, JCRB0211) を10%牛胎児血清 (FBS) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (以下DMEM、という) 中、100mmシャーレで培養した。52グループのG418耐性HFL-1 細胞を15%牛胎児血清 (FBS) と200  $\mu$ g/mlのG418を添加したF12中で、それぞれ100mmシャーレで培養した。マウスA9細胞とHFL-1 細胞をトリプシン処理後それぞれ四分の一から半分量ずつ混合し、100mmシャーレに播種し10%牛胎児血清 (FBS) を添加したDMEMと15%牛胎児血清 (FBS) を添加したF12との等量混合物中で半日から一日培養した。細胞融合は (清水ら、細胞工学ハンドブック, 羊土社, p.127-

, 1992) に記述されている方法に従った。DMEMで細胞表面を2回洗った後、2m1のPEG (1:1.4) 溶液で1分間処理し、さらに、2m1のPEG (1:3) 溶液に換え1分間処理した。PEG溶液を吸い取り、無血清培地 (DMEM) で3回洗った後、通常の培地 (10%FBS、DMEM) で1日間培養した。細胞をトリプシン処理により分散し、ウワバイン ( $1 \times 10^{-5}$  M, シグマ) およびG418 (800  $\mu$ g/ml) を含む二重選択培地 (10%FBS、DMEM) に懸濁し、100mmシャーレ3枚に播種した。約3週間培養した後、生じたコロニーをトリプシン処理により細胞を分散しG418 (800  $\mu$ g/ml) を含む選択培地 (10%FBS、DMEM) で培養した。

#### 【0074】

トリプシン処理により細胞を分散し2グループを一つにまとめて、6本の25cm<sup>3</sup>遠心用フラスコ (コースター、3025) にて細胞密度が70~80%飽和程度まで培養した。コルセミド (0.05  $\mu$ g/ml, デメコルシン, 和光純薬) を含む培養液 (20% FBS、DMEM) に交換し、2日間培養しミクロセルを形成させた。培養液を除去し、予め保温 (37°C) しておいたサイトカラシンB (10  $\mu$ g/ml, シグマ) 溶液を遠心用フラスコに満たし、アクリル製遠心容器に遠心用フラスコを挿入し、34°C、8000rpm, 1時間の遠心を行なった。ミクロセルを無血清培地に懸濁し、フィルターで濾過し精製した。マウスA9細胞を80%飽和の状態まで培養した25cm<sup>3</sup>フラスコに精製した微小核を加えPEG溶液で融合させた。G418を含む選択培地で培養しコロニーを単離した。

#### 【0075】

上記以外のすべての実験操作及び試薬等は〈清水ら、細胞工学ハンドブック、羊土社、p.127-〉に従った。

#### 【0076】

##### (2) ヒト7番染色体断片を保持するマウスA9細胞クローンの同定

上記のマウスA9細胞ライブラリーから、ヒトCYP3A遺伝子クラスターが存在する7番染色体断片を保持するクローンを、以下のようにしてヒトCYP3A4遺伝子を特異的に検出できるプライマーを用いてPCRにより同定した。

#### 【0077】

##### (CYP3A4検出用プライマー)

センス : 5'-GTCTGTCTGGGTTGGAAGG-3' (配列番号1)

アンチセンス : 5'-TCTGTGTTGCTCTTGCTGG-3' (配列番号2)

【0078】

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp 9600を用い、TaqポリメラーゼとしてEx Taq (宝酒造(株)) を用い、バッファー及びdNTP (dATP、dGTP、dCTP及びdTTP)はEx Taq (宝酒造(株)) に添付のものを推奨条件に従って用いた。PCRのサイクル条件は、94℃1分の熱変性後、98℃ 10秒、65℃ 30秒、72℃ 1分を1サイクルとして35サイクル行った。その結果、陽性クローンが20個得られた。さらに、これらのクローンに対して、ヒト7番染色体多型マーク (D7S664, D7S1496, D7S634, D7S648, D7S505, BIOS社) を用いてPCRを行った。結果を表1に示した。○は陽性、×は陰性であることを示す。

【0079】

【表1】

	4-39	5-49	6-64	4-38	4-45	3-37	4-46	1-1	3-24	E22	E31	E36	E62	E70	H5	T18	U10	U-17	Z9
D7S664	×	×	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	○	×	○	○	×	○	○
D7S634	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<b>CYP3A4</b>																			
PGY1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D7S648	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D7S505	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

【0080】

表1において、例えば、クローナH5やZ9は、7番染色体の全長を保持すると考えられた。一方、クローナE22はCYP3A4周辺のみを含んだ断片を保持すると考え

られた。次に、これらのクローンにおいて、ヒト7番染色体（断片）がどのように存在しているかを調べるために、ヒトCOT-1 DNAをプローブに用いたFISH解析を行った。方法は、W097/07671に記載された方法に従った。PCRの結果から予想されたように、クローンH5においては全長のヒト7番染色体が、クローンE22においては小さなヒト7番染色体断片が独立して存在していることが明らかとなつた。このクローンH5とE22をヒト7番染色体（断片）供与細胞として用いることとした。

## 【0081】

【実施例2】P450遺伝子の一分子種であるヒトCYP3Aファミリー遺伝子を含むヒト7番染色体断片のES細胞への導入

ヒトCYP3Aファミリー遺伝子をES細胞に導入することを目的とした、ミクロセル融合を試みた。

## 【0082】

## (1) ミクロセル調製用細胞の培養

ミクロセルを供与するA9細胞は、次に述べる条件で培養した。G418耐性遺伝子でマーキングされたヒト7番染色体を有するマウスA9細胞（E22）を、10%ウシ胎児血清（以下、「FBS」と略記する。シグマ）とG418（800  $\mu$ g/ml、ジェネティシン、ギブコ）を添加したダルベッコ改変イーグル培地（以下、「DMEM」と略記する。ニッスイ）で培養した。

## 【0083】

ミクロセル融合に供するES細胞（TT2F、ギブコ）は、融合を実施する1週間程前から、次に述べる手順で培養を行った。また、その後のミクロセル融合ES細胞（以下、「MH細胞」（Microcell-Hybrid ES）と略記する。）の取り扱いも以下の内容に準じて行った。ES細胞の培養は、20%FBS（ギブコ）、10  $\mu$ M非必須アミノ酸（ギブコ）、 $10^{-4}$  M 2-メルカプトエタノール（シグマ）、 $10^3$  U LIF（白血球増殖抑制因子、ギブコ）を添加したDMEM（以下、「ES用DMEM」と略記する。）を用いて行った。マイトマイシンC（シグマ）で処理したフィーダー細胞（Neo耐性初代培養細胞、ライフテック・オリエンタル）をあらかじめ播種した35mmディッシュ（コーニング）にES細胞を播種し、培養した。ES用DMEMを12時間おきに交換

した。継代は、2日おきに、目安としてES細胞の細胞密度が80%飽和状態に至った際に行った。ディッシュからES用DMEMを吸引した後にEDTA-PBSでディッシュを3回洗浄し、0.7mlの0.25%トリプシン（ギブコ）で15分間処理した。ディッシュにES用DMEMを添加してトリプシンの反応を止めて、ギルソンビペットマン（P-1000）にてピッティングにより、細胞懸濁液を15mlチューブ（ファルコン）に回収した後、卓上遠心器で1000rpm、5分間遠心して、細胞のペレットを得た。上清を吸引した後に、細胞を適量のES用DMEMで再懸濁してから、新たなフィーダー細胞播種済みのディッシュに播種した（相沢、ジーンターゲティング、羊土社参照）。

#### 【0084】

##### (2) ミクロセル融合

ミクロセルは、以下の手順で得た。E22細胞を24本の25cm<sup>2</sup>フラスコ（コースター、3025）中で、細胞密度が90%飽和状態になるまで培養した。培養液を、コルセミド（0.06μg/ml、デメコルシン、和光純薬）を含む培養液（20%FBS、DMEM）に交換し、2日間培養してミクロセルを形成させた。前記フラスコから培養液を除去し、あらかじめ37℃に保温しておいたサイトカラシンB（10μg/ml、シグマ）溶液を含むDMEMで、該フラスコをほぼ一杯になるまで満たした。アクリル製の遠心容器に、フラスコを挿入し温湯（34℃）を注入後、ゴム製のアダプター内にこの容器をセットして34℃、8000rpmで1時間遠心を行った。遠心分離後サイトカラシンBを含むDMEMを除去し、フラスコの底辺部に集積されたミクロセルをDMEMに懸濁して回収した。回収したミクロセル懸濁液をフィルターのメンブラン上の孔径が8μm、5μm、3μmのフィルターの順に濾過しミクロセルを精製した。精製したミクロセルを1500rpm、10分間遠心後5mlのDMEMで再懸濁してから再び1500rpm、5分間遠心、遠心後のチューブは上清を除去せず4℃で保存しその後のミクロセル融合に供した。

#### 【0085】

ミクロセル融合は以下の手順で行った。60mmディッシュ（コーニング）2枚分のES細胞をEDTA-PBSで3回洗浄し、トリプシンで処理して細胞をディッシュから剥離し、ES用DMEMで懸濁後、15mlチューブに回収して1500rpm、5分間遠心して細

胞を回収した後、上清を吸引した。チューブをタッピングした後、DMEMで細胞を3回洗浄した。洗浄の後、5mlのDMEMで細胞を再懸濁し、これを先に回収しておいたミクロセルの溶液上に静かに重層し、1250rpm、5分間遠心した。遠心後、上清を吸引し、細胞塊をタッピングしてほぐして1分間放置した。PEG1500（ポリエチレンギリコール、和光純薬）入りDMEM 0.5mlをチューブの内壁を伝わらせて添加し、1.5分間処理した。PEG1500入りDMEM添加開始から1.5分後に、DMEM9.5mlをチューブに徐々に添加し緩やかに細胞を懸濁した。懸濁後、1250rpm、5分間遠心して上清を除去し、6mlのES用DMEMで細胞を懸濁して、あらかじめ用意しておいた3枚のフィーダー細胞播種済み100mmディッシュ（コーニング）に2mlずつ懸濁液を添加し、100mmディッシュ1枚あたり10mlの培養液で培養を行った。培養は、ES細胞がおよそ50%飽和状態になる48時間後までES用DMEMで培養し、その後G418（ジエネティシン、ギブコ）を実効濃度150μg/mlとなるよう添加したES用DMEM（以下、「G418添加ES用DMEM」と略記）で培養した。培養開始から8～10日でG418耐性クローニングの出現を確認した。出現したG418耐性クローニングを単離し、フィーダー細胞播種済み24穴プレート（コーニング）に播種、その後フィーダー細胞播種済み12穴プレート（コーニング）、35mmディッシュの順に培養スケールを大きくした。

## 【0086】

## (3) PCR解析

選択培養の結果、計29個のG418耐性クローニングを得た。これらのクローニングよりPu regene DNA Isolation Kit (Gentra System社) を用いてゲノムDNAを抽出し、PCRによる分析に供した。PCRは、抽出したゲノムDNAを錆型とし、CYP3Aファミリー遺伝子（CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7）を検出する目的のために作製したプライマーを用いて行った。こうして、CYP3Aファミリー遺伝子を含んだヒト7番染色体を有するクローニングを同定した。CYP3A4を検出するためのプライマーは、先述の配列番号1と2のプライマーを用いた。CYP3A5およびCYP3A7を検出するためのプライマ一配列は、それぞれ次に示した配列のものを用いた。

## 【0087】

## (CYP3A5検出用プライマー)

センス : 5'-ATAGAAGGGTCTGTCTGGCTGG-3' (配列番号3)

アンチセンス : 5'-TCAGCTGTGTGCTGTTGTC-3' (配列番号4)

(CYP3A7検出用プライマー)

センス : 5'-ACCCCTGAAATGAAGACGGGC-3' (配列番号5)

アンチセンス : 5'-GAGTTAATGGTGCTAACTGGGG-3' (配列番号6)

### 【0088】

PCRの反応液は、10× Ex Taq Buffer (宝酒造) 3μl、dNTP (dATP、dGTP、dCTP及びdTTP、各2.5mM) (宝酒造) 4.8μl、各プライマー10pmol、ゲノムDNA 100ng、Ex Taq(5U/ml) (宝酒造) 0.5μlに滅菌蒸留水を添加して計30μlにして、PCR用チューブ (パーキンエルマー) に分注した。PCR反応液の調製の過程の操作は、全て氷上にて行った。サーマルサイクラー (GeneAmp PCR system 2400、パーキンエルマー) を85℃にセットし、85℃に達したことを確認してからチューブをセットした。85℃ 3分、94℃ 1分、85℃ 1分からなるpre-PCRの後、98℃ 10秒、62℃ 30秒、72℃ 1分を1サイクルとして35サイクル行った。この結果、上記3種類のヒトCYP3Aファミリー遺伝子が検出されたクローンが25個確認された。これらのクローンは、CYP3A遺伝子を含むヒト7番染色体断片を有するESクローンであることが示唆された。

### 【0089】

【実施例3】CYP3Aファミリー遺伝子を含むヒト7番染色体断片保有ES細胞を用いたキメラマウスの作製

ミクロセル融合により得られたヒト7番染色体保有MH細胞を用いて、CYP3Aファミリー遺伝子含むヒト7番染色体断片を体細胞中に保有するマウスの作製を行った。MH細胞の培養方法は、前述のES細胞の培養方法と同じであるが、MH細胞の維持、増殖には、G418添加ES用DMEMを用いた。

### 【0090】

#### (1) マウス胚の採取と培養

キメラ作製に用いるマウス胚は、MCH系 (日本クレア) マウスから採取した。6～8週齢のMCH系メスマウスに妊馬血清性腺刺激ホルモン (セロトロピン、帝国臓器) 7.5IUを腹腔内に注射した後48時間で、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (ペ

ローゲン、三共) 7.5IUを腹腔内に注射し、同系オスマウスと一晩同居し交配させた。ヒト総毛性性腺刺激ホルモンを注射してから60~64時間後にメスマウスを屠殺し、卵管から8細胞期胚をM2メディウム(シグマ)を用いて卵管灌流により回収した。60mmディッシュ(コーニング)上に30μl程度のM16メディウム(シグマ)の液滴を滴下し、さらにその上にパラフィンオイル(ナカライトスク)を重層した。回収したマウス胚をパストールピペットで少量のM16培養液と共に吸引し、ディッシュ上の液滴内にパストールピペットの先端を入れ吸引していたマウス胚を吐き出した。ディッシュ内のマウス胚は5% CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で、必要になるまで培養した。

## 【0091】

## (2) 細胞注入用ピペットおよび胚保持用ピペットの作製

細胞注入用ピペットは、ガラス管(Microcaps25、ドラモント)を微小電極作製器(PN-3、ナリシゲ)にセットしてガラス管を引き、実体顕微鏡(SMZ、ニコン)下でガラス管の先端部分を観察しながら先端が鋭利なピンセットで加工することにより、作製した。胚保持用ピペットは、ガラス管(GDC-1、ナリシゲ)をガスバーナーの小炎で熱して細く引き、アンプルカッターで適度な長さに切断しマイクロフォージ(MF-90、ナリシゲ)に装着し、外径が150μm程度で切り口が平坦であることを確認して、電熱線により内径を10μm程度にし、ガスバーナーの小炎で一箇所を曲げることにより作製した。

## 【0092】

## (3) MH細胞のマウス8細胞期胚への注入

キメラ作製に供するMH細胞は、0.25%トリプシン(ギブコ)で処理し、1000rpm、5分間遠心して回収した後、ES用DMEMで懸濁した。この細胞懸濁液を100mmディッシュ(コーニング)に30μl程度滴下し、パラフィンオイル(ナカライトスク)を重層し、これをマイクロマニュピュレーター(MMW-202、MMW-204、ナリシゲ)を装着した倒立顕微鏡(TMD、ニコン)のステージ上に静置した。内部を滅菌蒸留水で満たしたマイクロインジェクター(IM-5、ナリシゲ)にマウス胚保持用のガラス製ピペットを装着し、内部を空気で満たしたマイクロインジェクター(IM-6、ナリシゲ)に細胞注入用ガラス製ピペットを装着した。倒立顕微鏡の視野

の中央にMH細胞懸濁液のスポットがくるようにし、細胞注入用ガラス製ピペットをスポット内に入れてMH細胞を吸引した。採卵後、培養していたマウス8細胞期胚20~30個をパストールピペットでスポットに移した。胚保持用ピペットでマウス胚を保定して胚に焦点を合わせ、注入用ピペットを操作して透明体を貫通させ、囲卵腔内にMH細胞を10~15個注入した。上記操作を繰り返し行って得えられた操作胚は、先述の60mmディッシュ上に液滴として置きパラフィンオイルを重層したM16メディウム中に移して、胚盤胞期胚に発生するまで培養し、翌日移植に供した。

## 【0093】

## (4) 胚の移植

8週齢以上のMCH系メスマウス（日本クレア）を、精管結紮した同系オスマウスと一緒に居、交配させ、翌日膣栓を確認したものを偽妊娠メスマウスとして仮親に用いた。交配させた翌日を妊娠第1日として、妊娠第4日目のマウスを胚移植に供した。麻酔にはトリブロモエタノールアミン（アルドリッヂ）をアミルアルコール（アルドリッヂ）に溶解し、生理食塩水で2.5%濃度になるよう希釈したアバーチンを用いた。アバーチンをマウスの体重に応じて腹腔内に注射して麻酔をかけた。同マウスの背部の毛を刈り、アルコール綿で消毒した後に、外皮を脊椎に沿って切開し、筋層と外皮の間にハサミを入れて両者を剥離した。卵巣を覆う筋層を切開し、脂肪組織をピンセットでつまみ、卵巣、卵管、子宮角の上部を滅菌した濾紙の上に引き出した。移植用ピペットはガスバーナーで熱して一箇所を折り曲げ、内径が胚1個分より若干大きくなるよう加工した。

## 【0094】

培養していた胚のうち、形態的に正常な胚盤胞期胚又は桑実期胚をM2メディウムで洗浄した後、少量のM2メディウムとともに移植用ピペットに吸入した。吸入は毛細管現象を利用してM2メディウムを吸入してから空気を入れてピペット内に小さな気泡を1~2個作り、次に10個程度の移植する胚を間隔が空かない様にしてM2メディウムとともに吸入し、最後に空気の小さな気泡を1個入れて先端部を少量のM2メディウムで満たした。太い血管を避けて子宮角上部に26G注射針（テルモ）で穴を開けてピペットの先端を子宮内に挿入し、胚を静かに注入した。左右

の子宮への移植が終了したら、筋層を縫合し、外皮をオートクリップ（ファルコン）でとめた。

## 【0095】

## (5) PCR解析

仮親は、胚移植から16~17日で産仔を出産し、生後3週間で離乳するまで哺育させた。妊娠が確認されながらも正常に分娩できない仮親については、出産予定期を過ぎて1日以内に帝王切開して産仔を取り出し、哺育中のメスマウスに里子としてつけて哺育させた。生後3週間で離乳した産仔は性別によってケージを分け、また、個体識別のために耳にパンチングして穴をあけた。個体識別後のマウスは尾部を1~1.5cm程度切断し、さらに手術用鉄で細切した。サンプルを15mlチューブに移し、*Puregene DNA Isolation Kit* (Gentra System 社) を用いてゲノムDNAを抽出し、これを鋳型としてPCRを行った。

## 【0096】

CYP3Aファミリー遺伝子 (CYP3A4、CYP3A5、CYP3A7) を検出する目的のために作製したプライマーを用いてPCRを行うことで、これらCYP3Aファミリー遺伝子を含んだヒト7番染色体を有するマウス個体を同定した。CYP3A4を検出するためのプライマー配列は配列番号1および2、CYP3A5を検出するためのプライマー配列は配列番号3および4、CYP3A7を検出するためのプライマー配列は配列番号5および6のものをそれぞれ用いた。

## 【0097】

PCRの反応液は、10×Ex Taq Buffer (宝酒造) 3μl、dNTP(dATP、dGTP、dCTP及びdTTP、各2.5mM) (宝酒造) 4.8μl、各プライマー10pmol、ゲノムDNA100ng、Ex Taq(5U/ml) (宝酒造) 0.5μlに滅菌蒸留水を添加して計30μlにして、PCR用チューブ (パーキンエルマー) に分注した。PCR反応液の調製の過程の操作は全て氷上にて行った。サーマルサイクラー (GeneAmp PCR system 2400、パーキンエルマー) を85℃にセットし、85℃に達したことを確認してからチューブをセットした。85℃ 3分、94℃ 1分、85℃ 1分のpre-PCRの後、98℃ 10秒、62℃ 30秒、72℃ 1分を1サイクルとして35サイクルの反応を行った。この結果、上記3種類のヒトCYP3Aファミリー遺伝子の何れかが検出されたマウス個体が確認された。

これらのマウスはCYP3Aファミリー遺伝子を含むヒト7番染色体断片を保有するキメラマウスであると考えられた。

## 【0098】

【実施例4】CYP3Aファミリー遺伝子を含むヒト7番染色体断片を保有するキメラマウスにおけるCYP3A4遺伝子の発現の検定

作製されたマウスのうち、PCR解析によってCYP3Aファミリー遺伝子を含むヒト7番染色体断片を保有するキメラマウス（以下、「キメラマウス」と略記する）と考えられた個体に関して、導入されたCYP3A4遺伝子が個体レベルで発現しているのかを確認するため、RT-PCRによる解析を行った。

## 【0099】

CYP3A4の発現を誘導する物質として知られるリファンピシン（rifampicin）（シグマ）がキメラマウスにおけるCYP3A4遺伝子の発現に及ぼす影響についても同時に検討するため、RNAを抽出するマウスを表2に示すように設定した。なお、投与液はリファンピシンをコーンオイル（シグマ）に懸濁して調製した。また、一回の投与量は100mg/kgとした。

## 【0100】

## 【表2】

検体	処理方法
キメラマウス	リファンピシン 100mg/kg を4日間腹腔内投与
キメラマウス	媒体（コーンオイル）を4日間腹腔内投与
MCH系マウス	リファンピシン 100mg/kg を4日間腹腔内投与
MCH系マウス	媒体（コーンオイル）を4日間腹腔内投与

## 【0101】

これらのマウスから、肝臓、小腸、腎臓、脾臓、肺、心臓の各種臓器を摘出し、液体窒素により急速凍結後破碎してISOGEN（ニッポンジーン）により全RNAを抽出した。抽出したRNAはRNaseを含まない滅菌水（RNase free water）に溶解し

てから-80°Cで保存し、必要に応じてその一部をcDNA合成に用いた。

## 【0102】

次に、各種臓器のRNA溶液の一部からcDNAを合成した。まず、RNA溶液に混入しているゲノムDNAの除去のため、1.5mlチューブにRNA 1~5μg、DNaseI (ギブコ) 1μl、10× DNaseI reaction buffer (ギブコ) 1μl、RNase free waterで全量10μlとし、室温で15分間インキュベートしてDNaseによる処理を行った。この反応液に25mM EDTA 1μlを添加してDNaseの反応を止め、さらに65°Cで10分間インキュベートした。

## 【0103】

次に、Super Script<sup>TM</sup> Preamplification System (ギブコ) を用いてcDNA合成を行った。上記のDNase処理済のRNA溶液にRandom hexamers (ギブコ) 1μlを添加し、70°Cで10分間インキュベートしてからチューブを氷上に移した。このチューブに10×PCR buffer (ギブコ) 2μl、25mM MgCl<sub>2</sub> 2μl、dNTP(dATP、dGTP、dCTP及びdTTP、各10mM) 1μl、0.1M DTT 2μlをそれぞれ添加し、緩やかに混和後、25°Cで5分間インキュベートした。これに逆転写酵素 (Super ScriptII RT、ギブコ) 1μlを添加し、25°C 10分間、42°C 50分間、70°C 15分間の順にインキュベートしてから、チューブを氷上に移した。さらに、E. coli RNaseH (ギブコ) を1μl添加し、37°Cで20分間インキュベートして溶液内に残留しているRNAを除去した。

## 【0104】

次に、合成されたcDNAを鋳型としてPCRを行った。CYP3A4のcDNAを検出する目的のために作製したプライマーを用いて、各臓器における遺伝子発現の検討を行った。プライマー配列は、以下に示す配列のものを使用した。

## 【0105】

(CYP3A cDNA検出用プライマー配列)

センス : 5'-CAAGACCCCTTGTGGAAAA-3' (配列番号7)

アンチセンス : 5'-TCTGAGCGTTTCATTACCCA-3' (配列番号8)

## 【0106】

PCRの反応液は、10×Ex Taq Buffer (宝酒造) 3μl、dNTP(dATP、dGTP、dCTP

及びdTTP、各2.5mM) (宝酒造) 4.8μl、各プライマー10pmol、ゲノムDNA 100ng、Ex Taq(5U/ml) (宝酒造) 0.5μlに滅菌蒸留水を添加して計30μlにして、PCR用チューブ(パーキンエルマー)に分注した。PCR反応液の調製の過程の操作は全て氷上にて行った。サーマルサイクル(GeneAmp PCR system 2400、パーキンエルマー)を94℃にセットし、94℃に達したことを確認してからチューブをセットした。94℃ 5分のpre-PCRの後、94℃ 30秒、60℃ 1分、72℃ 1分を1サイクルとして35サイクルの反応を行い、さらに、72℃で15分処理した。各マウスの肝臓のサンプルについて電気泳動を行い、CYP3A4の発現の有無を調べたところ、リファンピシンを投与したキメラマウスの肝臓においてCYP3A4の発現を認めた。

#### 【0107】

上記の結果が、マウス内因性Cyp遺伝子など他の遺伝子のmRNA由来のcDNAを誤って増幅した結果によることも懸念されたため、リファンピシン投与したキメラマウスのサンプルを制限酵素EcoRIで処理した。ヒトのCYP3A4の産物が増幅された場合はEcoRI処理によって一箇所切断されるはずであったが、予想通り250bp附近に2本のバンドが得られた(図1)。図中の②はリファンピシン投与マウス肝由来のPCR産物をEcoRI処理した結果、③はヒト肝由来RNAのPCR産物をEcoRI処理した結果、④はリファンピシン投与マウス肝由来のPCR産物、⑤はヒト肝由来RNAのPCR産物である。さらに、このPCR産物の遺伝子配列を解析した結果、ヒトCYP3A4遺伝子の配列の一部と一致することが確認された。その他の臓器についてもCYP3A4の発現について調べたところ(図2)、リファンピシンを投与したキメラマウスの肝臓(図中①)と小腸(図中②)にヒトCYP3A4遺伝子の発現が認められた。

#### 【0108】

【実施例5】CYP3Aファミリー遺伝子を含むヒト7番染色体断片保有TC(Trans-Chromosomal)マウスの作製

作製されたキメラマウスをファウンダーとして、ヒト7番染色体断片を持つ子孫マウス(TCマウス)の作製を試みた。

#### 【0109】

ファウンダーとするキメラマウスは、ヒトCYP3A4、3A5、3A7が確認された100

%キメラ（体表の100%の部分でアゲーチの色を示す個体）を用いた。使用しているMH細胞はTT2F由来であるため、100%キメラマウスは全てメスの表現型を示し、これをMCH系のオスマウスと同居させ、交配して産仔を得た。得られた同腹の11匹のF1世代の産仔について、尾部を1~1.5cm程度切断し、さらに手術用鉗で細切した。サンプルを15mlチューブに移しPuregene DNA Isolation Kit (Gentra System 社) を用いてゲノムDNAを抽出し、これを鑄型としてPCRを行った。CYP3Aファミリー遺伝子 (CYP3A4、CYP3A5) を検出する目的のために作製したプライマーを用いてヒト7番染色体を有するTCマウス個体を同定した。

## 【0110】

(CYP3A4検出用プライマー)

センス : 5'-GCCATAGAGACAAGGGCAAG-3' (配列番号9)

アンチセンス : 5'-TCAGTGAGGCTGTTGGATTG-3' (配列番号10)

(CYP3A5検出用プライマー)

センス : 5'-CTGGTCACCCACCATGTGTA-3' (配列番号11)

アンチセンス : 5'-TATCCTCTCACCTGCCCTTG-3' (配列番号12)

## 【0111】

PCRの反応液は、10×Ex Taq Buffer (宝酒造) 3μl、dNTP(dATP、dGTP、dCTP 及びdTTP、各2.5mM) (宝酒造) 4.8μl、各プライマー10pmol、ゲノムDNA 100ng 、Ex Taq(5U/ml) (宝酒造) 0.5μlに滅菌蒸留水を添加して計30μlにして、PCR用チューブ (パーキンエルマー) に分注した。PCR反応液の調製の過程の操作は全て氷上にて行った。サーマルサイクラー (GeneAmp PCR system 2400、パーキンエルマー) を85°Cにセットし、85°Cに達したことを確認してからチューブをセットした。85°C - 3分、94°C - 1分、85°C - 1分のpre-PCRの後、94°C - 30秒、62°C - 45秒、72°C - 1分のサイクルを40回行った後、72°Cで20分間処理した。この結果、CYP3A4に関しては5個体で検出され、CYP3A5については1個体で検出された。以上の結果から、CYP3A4と3A5の両方が検出された1個体について、CYP3Aファミリー遺伝子を含むヒト7番染色体断片を保有するTCマウスであると判断した。

## 【0112】

【実施例6】マウス内在性Cyp3a遺伝子クラスターの物理地図作製

## (1) Cyp3a11、13、16、25を含むBACクローンの単離

マウス (C57BL/6、129/Sv) 由来のBACライブラリー (クラボウ) から、PCR及びハイブリダイゼーションによって、Cyp3a11、13、16又は25を含むBACクローンの単離を行った。

Cyp3a11、13、16、25の各々の遺伝子を検出するためのPCRプライマーには以下の配列を用いた。

## 【0113】

## (Cyp3a11検出用プライマー)

センス : 5'-GACACAATTGTCAAGGGATGG-3' (配列番号13)

アンチセンス : 5'-GCTGACAAACAAGCAGGGAT-3' (配列番号14)

## (Cyp3a13検出用プライマー)

センス : 5'-ATGTACCTGCCCTTGGGAG-3' (配列番号15)

アンチセンス : 5'-GGAGTGGGTTTCTGGTGA-3' (配列番号16)

## (Cyp3a16検出用プライマー)

センス : 5'-TGGTCTCCCATATCTCAGGC-3' (配列番号17)

アンチセンス : 5'-CAATGTACCAAGTGAGAGCGC-3' (配列番号18)

## (Cyp3a25検出用プライマー 1)

センス : 5'-AGAAGAAGAGAAAGGGAGCC-3' (配列番号19)

アンチセンス : 5'-CATTCAACCACCATGTCCAGG-3' (配列番号20)

## (Cyp3a25検出用プライマー 2)

センス : 5'-AAACCAGAAGAACCGAGTGG-3' (配列番号21)

アンチセンス : 5'-GTGACAGGTGCCTTATTGGG-3' (配列番号22)

## 【0114】

さらに、Cyp3a11、13、16においては、C57BL/6マウス由来のゲノムDNAをテンプレートとしてPCRを行い、その産物をハイブリダイゼーション用のプローブに用いた。Cyp3a25については、Mouse liver QUICK-Clone cDNA (クローンテック) をテンプレートとしてPCRを行い、その産物をハイブリダイゼーション用のプローブに用いた。PCRは、サーマルサイクラーとして、Perkin-Elmer社製のGeneAmp 9600を用い、TaqポリメラーゼはEx Taq (宝酒造) を用い、バッファーやdNTP

(dATP、dGTP、dCTP及びdTTP) はEx Taq (宝酒造) に添付のものを推奨条件に従って用いた。サイクル条件は、94℃1分の熱変性後、98℃ 10秒、65℃ 30秒、72℃ 1分を1サイクルとして35サイクル行った (以下に述べるPCRも、断りのない限り、全てこの条件で行った)。

## 【0115】

実際のマウスBACライブラリー (クラボウ) のスクリーニングは、クラボウの受託スクリーニングによって行い、以下の結果を得た。

## 【0116】

## 【表3】

遺伝子	スクリーニング方法	BACの由来	陽性クローン数
Cyp3a11	PCR	129/Sv	1クローン
	ハイブリダイゼーション	C57BL/6	3クローン
Cyp3a13	PCR	129/Sv	1クローン
	ハイブリダイゼーション	C57BL/6	2クローン
Cyp3a16	PCR	129/Sv	3クローン
	ハイブリダイゼーション	C57BL/6	8クローン
Cyp3a25	ハイブリダイゼーション	C57BL/6	2クローン

## 【0117】

## (2) Cyp3a11、13、16、25を含むBACクローンのコンティグ作製

上記の陽性BACクローン (Cyp3a11, 13, 16, 25のいずれかを含むクローン) から、プラスミド自動抽出装置 (クラボウ) を用いてBAC DNAを抽出し、Hybond-N+メンブレン (アマシャム) にスポットし、Cyp3a11、13、16、25を特異的に検出できるプローブ (BACライブラリーのスクリーニングに用いたもの) を用いてドットハイブリダイゼーションを行った (プローブの作製、条件などは、Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1994に従った)。その結果を図3に示した (全てのBACクローンではなく、代表的な

クローンのみを表示した)。

【0118】

Cyp3a11と16の両プローブで陽性となるBACクローンが数クローン存在した(例えば、クローン680)。これらのクローンに対して、配列番号13と17のプライマーでシークエンス解析を行った結果(東レリサーチセンターへ委託)、確かに同一のBACクローン中にCyp3a11と16のシークエンスが存在することが明らかとなった。このことは、Cyp3a11と16とがおよそ100 kb以内の距離で隣接して存在していることを示している。次に、この3a11-3a16を含むBACクローンが3a13、3a25を含むBACクローンとどのような位置関係にあるかを調べるために、3a11、16のみを含むBACクローン(例えば、それぞれクローン679、740)の末端シークエンシングを行った(東レリサーチセンターへ委託)。BACベクター中にはインサートDNAのクローニング部位の両端にT7プロモーターとSP6プロモーターのシークエンスが存在し、これらをプライマーに用いることで両末端のシークエンスが可能になる。クローン679のSP6側のシークエンスから以下のプライマーを設計し、残りのBACクローンに対してPCRを行った。

【0119】

(クローン679のSP6側プライマー)

センス : 5'-TAGGGTGAAGACATGGTGGC-3' (配列番号23)

アンチセンス : 5'-GGAGGAGAGGGAGATGTTGAT-3' (配列番号24)

【0120】

その結果、3a25を含むクローン9736と273P5とが陽性にあった。前述したように、配列番号23のプライマーでクローン9736と273P5をシークエンス(東レリサーチセンターへ委託)した結果、確かにクローン679とクローン9736、273P5とがリンクしていることが明らかとなった。このことから、3a16-3a11-3a25の順序で染色体上に存在していると考えられた。一方、3a16のみを含むBACクローン740をSP6プライマーでシークエンス(東レリサーチセンターへ委託)し、ホモロジー検索を行った結果、いくつかのジンクフィンガー遺伝子とヒットした。実際にこのDNAシークエンスをコンピューター上でアミノ酸配列に翻訳すると、C2H2タイプのジンクフィンガーモチーフ(例えば、Kuroiwaら, *Natur Genet.*, 12:186-1

90, 1996) と思われるアミノ酸配列が存在した。このことから、3a16-3a11-3a25クラスターの外側にはジンクフィンガー遺伝子 (Zfpと呼ぶ) が存在している可能性が考えられる (Zfp-3a16-3a11-3a25)。

#### 【0121】

また、3a16のみを含むBACクローン741をT7プライマーでシークエンス (東レリサーチセンターへ委託) し、ホモロジー検索を行った結果、3a11, 13, 16, 25と相同性を示すが、いずれの4遺伝子とも一致はしない配列が存在することが分かった。このことは、新規のCyp3a遺伝子の存在を示唆し、仮にCyp3aYと呼ぶこととする。BACクローン741は3a16のみを含み、かつその末端に3aYが存在することから、Zfp-3aY-3a16-3a11-3a25の順番で染色体上に存在していることが示唆され、3aYがクラスターの一端であると考えられた。さらに、BACクローン740をT7プライマーでシークエンス (東レリサーチセンターへ委託) し、ホモロジー検索を行った結果、ラットのCyp3A遺伝子と高い相同性を示し、マウスでは3a13とのみ弱い相同性を示す配列が存在することが分かった。このことも、さらなる新規のCyp3a遺伝子の存在を示唆し、仮にCyp3aXと呼ぶこととする。BACクローン740は3a16のみを含み、かつその末端に3aXが存在することから、Zfp-3aY-3a16-3aX-3a11-3a25の順番で染色体上に存在していることが示唆された。

#### 【0122】

次に、3a25がこのクラスターの残りの一端である可能性を検討するために、3a25を含むBACクローン9736に対してT7プライマー及びSP6プライマーを用いて末端シークエンシングを行った (東レリサーチセンターへ委託)。このシークエンスを基に以下のSTSプライマーを設計した。

#### 【0123】

(クローン9736のT7側プライマー)

センス : 5'-AGATGTGTGGCCTTGTAAAGG-3' (配列番号25)

アンチセンス : 5'-TTTCTGGATGTCACTGGTCC-3' (配列番号26)

#### 【0124】

このプライマーを用いて手元のBACクローン (Cyp3a11, 13, 16, 25のいずれかを含むBACクローン) に対してPCRを行った結果、T7側がクラスターの外側に位置

することが分かったので、このプライマーで更なるマウスBACライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、クローン29H12が得られ、同様に末端シークエンシングを行い、以下のSTSプライマーを設計した。

## 【0125】

(クローン29H12のSP6側プライマー)

センス : 5'-TAGAAGCCCAACTTGGGAC-3' (配列番号27)

アンチセンス : 5'-AGCCAACAAAGAGGGTGTACG-3' (配列番号28)

## 【0126】

このプライマーを用いて手元のBACクローンに対してPCRを行った結果、SP6側がクラスターの外側に位置することが分かったので、このプライマーで更なるマウスBACライブラリーのスクリーニングを行い、クローン41012を得た。ここで、「発明の実施の形態」の項に述べたように、クラスターの末端を決めるために、3a25の全長に近いcDNAプローブを用いて、得られた全てのBACクローン (Cyp3a11, 13, 16, 25のいずれかを含むBACクローンとそれらに隣接したBACクローン) に対して、緩い条件でのハイブリダイゼーションを行った。cDNAプローブは以下のプライマーを用いてMouse liver QUICK-Clone cDNA (クローンテック) をテンプレートとしてPCRを行うことによって作製した。

## 【0127】

(Cyp3a25用プライマー 3)

センス : 5'-GGCCTGAACTGCTAAAGGAAAGCTA-3' (配列番号29)

アンチセンス : 5'-GGTGAACATCCACAACTACCATTGAG-3' (配列番号30)

## 【0128】

ハイブリダイゼーションの条件は60°Cで行い、洗浄は2×SSC, 0.1% SDS存在下、60°Cで行った以外は、上記と同様である。その結果、クローン41012のみが陰性であったため、クラスターはクローン29H12までで、従って3aY-3a16-3aX-3a11-3a25で完結していると考えられた。

## 【0129】

(3) Cyp3a13近傍のBACコンティグの作製

Cyp3a13を含むBACクローン (クローン703, 503, 705) は、上記のスクリーニ

ングの範囲では、Cyp3a11、16、25を含むいずれのBACクローンともつながらなかった。そこで、クローン703を出発材料として、上記のように染色体ウォーキングを行うこととした。まず、クローン703の末端シークエンス（東レリサーチセンターへ委託）を行い、以下のプライマーを設計した。

## 【0130】

（クローン703用SP6側プライマー）

センス : 5'-ACAGGGAGTAGGTGACACTGTTG-3' (配列番号31)

アンチセンス : 5'-GGGTTGTTGGACTCACAGAGAG-3' (配列番号32)

## 【0131】

（クローン703用T7プライマー）

センス : 5'-GACCTCACACTGGCAAGAAGTC-3' (配列番号33)

アンチセンス : 5'-ATGGTGCTCAGCAATAGTAGGG-3' (配列番号34)

## 【0132】

これらのプライマーを用いてBACライブラリーをスクリーニングすることによって、クローン703のSP6側とT7側の両方向に対して染色体ウォーキングを行うことができる。まず、703/T7プライマーを用いてスクリーニングした結果、クローン220H2と234H9が得られた。これらのクローンの末端シークエンス（東レリサーチセンターへ委託）を行い、以下のプライマーを設計した。

## 【0133】

（クローン220H2用T7側プライマー）

センス : 5'-GCAGGATACCAAGATATGTGGC-3' (配列番号35)

アンチセンス : 5'-AAACCCCTTAAACCCACAGC-3' (配列番号36)

## 【0134】

（クローン220H2用SP6側プライマー）

センス : 5'-GGTGTACACGCCCTTCATC-3' (配列番号37)

アンチセンス : 5'-CTGCTCAAAGGAGAACAGGG-3' (配列番号38)

## 【0135】

これらのプライマーを用いて手元のBACクローン（Cyp3a11, 13, 16, 25のいずれかを含むBACクローンとそれらに隣接したBACクローン）に対してPCRを行った

結果、SP6側が外側に位置することが分かったので、このプライマーで更なるBACライブラリーのスクリーニングを行い、クローン130A11と29B19を得た。これらのクローンの末端シークエンシングを行い、以下のプライマーを設計した。

【0136】

(クローン130A11用T7側プライマー)

センス : 5'-CCACACATTCTGCCAATCAG-3' (配列番号39)

アンチセンス : 5'-AGTACAGCACCGGGCTAAAG-3' (配列番号40)

【0137】

(クローン130A11用SP6側プライマー)

センス : 5'-GCAACAATAACCCAAC TGCC-3' (配列番号41)

アンチセンス : 5'-CAGGTGGTAATAAGCTGCC-3' (配列番号42)

【0138】

(クローン29B19用T7側プライマー)

センス : 5'-GCATGAAGCACTGTCTCGTC-3' (配列番号43)

アンチセンス : 5'-GGGGTCCTCCTTCAATATCC-3' (配列番号44)

【0139】

(クローン29B19用SP6側プライマー)

センス : 5'-TCTCTGCCTCTCATCTTAGCC-3' (配列番号45)

アンチセンス : 5'-TGTGTGTGGGTTGGTGTCTC-3' (配列番号46)

【0140】

これらのプライマーを用いて手元のBACクローン (Cyp3a11, 13, 16, 25のいずれかを含むBACクローンとそれらに隣接したBACクローン) に対してPCRを行った結果、クローン29B19のT7側が外側に位置することが分かったので、このプライマーで更なるBACライブラリーのスクリーニングを行い、クローン204B19と173D23を得た。これらのクローンの末端シークエンス (東レリサーチセンターへ委託) を行い、以下のプライマーを設計した。

【0141】

(クローン173D23用SP6側プライマー)

センス : 5'-CGGCTCTCACAAATAGACCC-3' (配列番号47)

アンチセンス：5'-CCAGGTATCGCTGGTCTTC-3' (配列番号48)

【0142】

このプライマーを用いて手元のBACクローン (Cyp3a11, 13, 16, 25のいずれかを含むBACクローンとそれらに隣接したBACクローン) に対してPCRを行った結果、クローン173D23のSP6側が外側に位置することが分かった。

一方、703/SP6プライマーを用いてスクリーニングした結果、クローン86H16が得られた。このクローンの末端シークエンシングを行い、以下のプライマーを設計した。

【0143】

(クローン86H16用SP6側プライマー)

センス : 5'-TCACGACCTTATGCAAAGACC-3' (配列番号49)

アンチセンス : 5'-CGGGAAGTATTGCTTCAGC-3' (配列番号50)

【0144】

(クローン86H16用T7側プライマー)

センス : 5'-TCAGTCGTTACCAGCCTTTG-3' (配列番号51)

アンチセンス : 5'-GAGTGGGCTCTGGTCATTC-3' (配列番号52)

【0145】

これらのプライマーを用いて手元のBACクローン (Cyp3a11, 13, 16, 25のいずれかを含むBACクローンとそれらに隣接したBACクローン) に対してPCRを行った結果、クローン86H16のSP6側が外側に位置することが分かったので、このプライマーで更なるBACライブラリーのスクリーニングを行い、クローン204L9を得た。

このクローンの末端シークエンス (東レリサーチセンターへ委託) をを行い、以下のプライマーを設計した。

【0146】

(クローン204L9用SP6側プライマー)

センス : 5'-TCTCAGCATAGTTCAGGGGC-3' (配列番号53)

アンチセンス : 5'-TTTCTTCAGCTCTGGGTGG-3' (配列番号54)

【0147】

このプライマーを用いて手元のBACクローン (Cyp3a11, 13, 16, 25のいずれか

を含むBACクローンとそれらに隣接したBACクローン)に対してPCRを行った結果、クローン204L9のSP6側が外側に位置することが分かったので、このプライマーで更なるBACライブラリーのスクリーニングを行ったが、204L9自身以外の陽性クローンはこのライブラリーには存在しなかった。この段階で、スクリーニングを一時中断し、上記のように3a25の全長に近いcDNAプローブを用いて、得られた全てのBACクローン(3a13を含むBACクローンのコンティグ)に対して、緩い条件でのハイブリダイゼーションを行った。その結果、陽性になったクローンは703, 503, 705, 9743, 220H2, 234H9, 130A11で、それよりもさらに外側に位置するBACクローン29B19, 204B19, 173D23, 9667, 86H16, 204L9は陰性だった。このことは、3a13の近傍には他に新規Cyp3a遺伝子は存在せず、3a13は上記のクラスター3aY-3a16-3aX-3a11-3a25とは離れて、孤立して染色体上に存在していることを示唆している。

#### 【0148】

以上の実験結果を図3にまとめた。赤いBACクローンは3a25の全長に近いcDNAプローブで陽性だったクローンで、黒いBACクローンは陰性だったクローンを示す。

#### 【0149】

【実施例7】マウスCyp3a遺伝子クラスター3aY-3a16-3aX-3a11-3a25を欠失させるためのターゲティングベクターの作製

##### (1) カセットベクターploxPUP, ploxPDOWNの作製

Cyp3a遺伝子クラスターの両端のそれぞれにloxPを挿入するためのカセットベクターploxPUP及びploxPDOWNを、以下のように作製した。まず、ploxPUPの作製について述べる。プラスミドpBluescript II SK(-) (東洋紡) を制限酵素EcoRV (ベーリンガー) で切断し、脱リン酸化酵素CIAP (仔牛小腸由来アルカリ脱リン酸化酵素、宝酒造) を用いて、50°Cで30分間反応し、切断末端を脱リン酸化した。これに、プラスミドpBS302 (ギブコ) から制限酵素SpeIとHindIII (ベーリンガー) で切り出してDNA Blunting kit (宝酒造) で平滑末端化したDNA断片を、DNA Ligation kit (宝酒造) を用いてライゲーションし、エシェリヒア・コリのコンピテントセルDH5 (東洋紡) を形質転換した (プラスミドpBS302HS)。平滑

末端化、ライゲーション及び形質転換は、各キットに添付のプロトコールに従つて行った。

#### 【0150】

次にプラスミドpSTneo (Katohら, Cell Struct. Funct., 12:575, 1987) から制限酵素XhoI (ベーリンガー) で切り出し、DNA Blunting kit (宝酒造) で平滑末端化したDNA断片を、プラスミドpBS302HSのSmaI部位 (上記と同様に、脱リン酸化処理した) にDNA Ligation kit (宝酒造) を用いてクローニングし、プラスミドploxPneoを得た。プラスミドpMC1DT-A (ギブコ) を制限酵素ApaI (ベーリンガー) で切断、平滑化、及び脱リン酸化し、リン酸化NotIリンカー (宝酒造) を挿入し、プラスミドpMC1DT-ANを得た。

#### 【0151】

同様にして、プラスミドpMC1DT-ANのSalI部位にSpeIリンカー (宝酒造) を挿入し、このプラスミドから制限酵素SpeIとNotI (ベーリンガー) で切り出したDNA断片を、SpeIとNotIで切断したプラスミドploxPneoにクローニングした。最後に、このプラスミドを制限酵素SalI (ベーリンガー) で切断、脱リン酸化し、プラスミドpGKpuro (WHITEHEAD INSTITUTE, Dr. Peter W. Lairdから分与) から制限酵素SalIとXhoI (ベーリンガー) で切り出したDNA断片をクローニングし、プラスミドploxPUPを得た。

#### 【0152】

次に、プラスミドploxPDOWNの作製について述べる。まず最初に、プラスミドpBluescript II SK(-) (東洋紡) のSacI部位に上記のようにしてFseIリンカーを挿入した。FseIリンカーは、以下の配列のオリゴDNAを合成し、5'末端をリン酸化した (合成はグライナーに委託)。

#### 【0153】

(FseIリンカー)

5'-pGGCCGGCC-3'

#### 【0154】

このプラスミドを制限酵素BamHI (ベーリンガー) で切断、脱リン酸化し、プラスミドpBS302 (ギブコ) から制限酵素BamHI (ベーリンガー) で切り出したDNA

断片をクローニングした。このプラスミドを制限酵素SalIとKpnI (ベーリンガー) で切断し、プラスミドpMC1DT-A (ギブコ) から制限酵素SalIとKpnI (ベーリンガー) で切り出したDNA断片をクローニングした (プラスミドploxPDT-A)。次に、プラスミドpGREEN LANTERN-1 (ギブコ) のCtaI部位に上記のようにSpeIリンクバー (宝酒造) を挿入し、このプラスミドから制限酵素SpeI (ベーリンガー) で切り出したDNA断片を、SpeIで切断後、脱リン酸化したプラスミドploxPDT-Aにクローニングした。最後に、このプラスミドを制限酵素SmaI (ベーリンガー) で切断、脱リン酸化し、プラスミドpGKPuroから制限酵素SalI (ベーリンガー) で切り出し、平滑化したDNA断片をクローニングした (プラスミドploxPDOWN)。

## 【0155】

上記のようにして構築したカセットベクターploxPUP及びploxPDOWNの構造を図4に示した。

## 【0156】

## (2) マウスCyp3a遺伝子クラスター両末端のゲノムDNAのクローニング

Cyp3a遺伝子クラスターの一端に相当するCyp3aY遺伝子領域のクローニングについて以下に述べる。図4に示したように、このクラスターのCyp3aY側で最も外側に相当するゲノム領域は、BACクローン741のT7末端領域であるので、この部分のクローニングを行った。BACクローン741を制限酵素XbaI (ベーリンガー) で切断すると、T7末端領域を含んだおよそ13 kbのDNA断片が得られ、これを制限酵素XbaIで切断したλ DASH IIベクター (ストラタジーン) にDNA Ligation kit (ストラタジーン) を用いてライゲーションし、Gigapack III Gold packaging extract (ストラタジーン) を用いてパッケージングした。パッケージングはキットに添付のプロトコールに従った。この組換えファージに対して、BACクローン741のT7末端プローブを用いてブラークハイブリダイゼーションを行い、BACクローン741のT7末端領域13 kbのDNA断片を含んだ組換えファージを得た。得られたファージをクローンλ UPと呼ぶ。BACクローン741のT7末端プローブは、以下のオリゴDNA (合成はグライナーに委託) を用いて行った。

## 【0157】

(クローン741用T7側プライマー)

センス： 5'-GTTCCCTCTGTAATTCTAATGTACATCCACTGGTTGAAAGGTCTATGATAA3' (配列番号55)

【0158】

ハイブリダイゼーションは、6×SSC, 0.5% SDS, 5×Denhardt中で57°C、オーバーナイトで行い、洗浄は2×SSC, 0.5% SDS中、65°Cで行った。

【0159】

次に、Cyp3a遺伝子クラスターの残りの一端に相当するCyp3a25遺伝子領域のクローニングについて以下に述べる。図5に示したように、このクラスターのCyp3a25側で最も外側に相当するゲノム領域は、BACクローン29H12のSP6末端領域であるので、この部分のクローニングを行った。このBACクローンは129/Svマウス由来であるので、29H12のSP6末端プローブを用いたC57BL/6マウス由来のゲノミックライブラリー（クローンテック）のスクリーニングから行った。29H12のSP6末端プローブは、配列番号27と28のプライマーで増幅したPCR産物を用い、プラクハイブリダイゼーションを行った。

【0160】

約200万ブラークをスクリーニングした結果、30個の陽性クローンが得られ、この内の6クローンを任意に選んで制限酵素地図の作製を行った。制限酵素SalIとEcoRI（ペーリンガー）で切断したところ、1つのクローン（λDOWN12）で約8kbのDNA断片が生じた。この断片はEcoRIのみで切断した際には生じなかったことから、その末端構造はSalI切断部位とEcoRI切断部位になっていると考えられる。この断片を、制限酵素SalIとEcoRI（ペーリンガー）で切断したプラスミドpBluescript II SK(-)（東洋紡）にクローニングし、プラスミドpDOWNを得た。挿入DNA断片についてプライマーM13-20でシーケンス（東レリサーチセンター）した結果、λファージベクターのSP6末端側であることが分かった。このシーケンスから以下のプライマーを設計した。

【0161】

（クローンλDOWN12用SP6側プライマー）

センス : 5'-TTCGGGAGGCCAGTACTATTG-3' (配列番号56)

アンチセンス : 5'-CACACACGTCTTTGGCAG-3' (配列番号57)

## 【0162】

このプライマーを用いて、BACクローン29H12と41012に対してPCRを行ったところ、29H12のみが陽性となったので、図5に示した位置関係にあることが分かった。

以上の結果から、Cyp3a遺伝子クラスターの両末端ゲノム領域に相当するクローンとして、 $\lambda$ ファージ $\lambda$ UPとプラスミドpDOWNを以下に述べるターゲティングベクター作製に用いることとした。

## 【0163】

## (3) ターゲティングベクターploxP3aUP, ploxP3aDOWNの作製

まず、ターゲティングベクターploxP3aUPの作製について述べる。 $\lambda$ ファージクローン $\lambda$ UPを制限酵素BamHIとHindIII（ベーリンガー）で切断すると約7.5 kbのDNA断片が生じ、これを制限酵素BamHIとHindIIIで切断したプラスミドpBluescript II SK(-)（東洋紡）にクローニングし、プラスミドpUPを得た。ただし、予めプラスミドpBluescript II SK(-)のXbaI部位を以下のようにして欠失させておいた。プラスミドpBluescript II SK(-)を制限酵素XbaI（ベーリンガー）で切断し、平滑末端化後、セルフライゲーションした。同様にして、プラスミドpUPのKpnI部位を欠失させた後、制限酵素XbaI（ベーリンガー）で切断し、平滑末端化後、KpnIリンク（宝酒造）を挿入した。このプラスミドを制限酵素Not IとXbaI（ベーリンガー）で切断し、プラスミドpMC1DT-ANから制限酵素Not IとSpeI（ベーリンガー）で切り出したDNA断片をクローニングした。最後に、このプラスミドを制限酵素KpnI（ベーリンガー）で切断、脱リン酸化し、プラスミドploxPUを制限酵素FseI（宝酒造）で切断し、平滑末端化後、KpnIリンク（宝酒造）を挿入し、制限酵素KpnI（ベーリンガー）で切り出したDNA断片をクローニングした（ターゲティングベクターploxP3aUP、図6）。

## 【0164】

次に、ターゲティングベクターploxP3aDOWNの作製について述べる。まず、プラスミドpDOWNを制限酵素EcoRI（ベーリンガー）で切断し、平滑末端化後、SalIリンク（宝酒造）を挿入した。このプラスミドを制限酵素NotIとSpI（ベーリンガー）で切断したものの、プラスミドpMC1DT-ANから制限酵素Not IとSpeI（ベ

ーリンガー)で切り出したDNA断片をクローニングした。次に、このプラスミドを制限酵素Not I (ベーリンガー)で切断し、平滑末端化後、SrfIリンカーを挿入した。SrfIリンカーは以下の合成オリゴDNA (グライナー) を用いた。

## 【0165】

(SrfIリンカー)

5'-pGCCCGGGC-3'

## 【0166】

このプラスミドを制限酵素XbaI (ベーリンガー)で切断し、平滑末端化後、前記のFseIリンカーを挿入した。このプラスミドを制限酵素FseI (宝酒造)で切断し、脱リン酸化した。このプラスミドに、プラスミドploxPDOWNを制限酵素KpnI (宝酒造)で切断し、平滑末端化後、前記のFseIリンカーを挿入し、制限酵素FseI (宝酒造)で切り出したDNA断片をクローニングした (ターゲティングベクター-ploxP3aDOWN、図7)。

## 【0167】

【実施例8】マウスES細胞Cyp3a遺伝子クラスターの一端にloxP配列を挿入した細胞株の取得

マウス内在性Cyp3a遺伝子クラスターを破壊するため、上記の実施例で示した2つのターゲティングベクターploxP3aUPとploxP3aDOWNを用いてCyp3a遺伝子クラスターの両末端にloxP配列を挿入した。まず、ターゲティングベクターploxP3aUPを制限酵素NotI (宝酒造)で線状化し、従来の方法 (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、羊土社、1995)に従い、マウスES細胞TT2Fへ導入した。具体的には、TT2F細胞をトリプシン処理し、 $2.5 \times 10^7$ 個 /ml となるように冷HBS (HEPES-buffered saline) に懸濁してから、ベクター5  $\mu$ g を加え、ジーンパルサー (バイオラッド) を用いて、250 V, 960  $\mu$ Fの条件でエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーションした細胞を8mlのES培地 (相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、羊土社、1995) に懸濁し、あらかじめフィーダー細胞をまいた60mmディッシュ8枚に播種した。48時間培養し、その後G418 (GIBCO) 300  $\mu$ g/ml (見かけ濃度) を含む培地中で約10日間選択培養した。生じたG418耐性コロニー144個をピックアップし

、48穴プレートでコンフルエントになるまで培養した後、48穴プレート1穴分の細胞を4穴プレート2穴に播種した。4穴プレート1穴分を-80℃にて凍結保存した。残りの1穴分はゲノムDNA取得用として3.5cmゼラチンコートしたディッシュに播種し培養した。その他のマウスES細胞の取り扱いの具体的な手順はW097/07671、W098/37757に記載の方法に従った。

#### 【0168】

ゲノムDNAの抽出は、フェノール法により行った。抽出したゲノムDNAを制限酵素HindIII (NEB) で消化し、アガロースゲル電気泳動で分離後、サザンハイブリダイゼーションにより、相同組換え体 (ES/loxP3aUPと呼ぶ) の同定を行った。ターゲッティングベクターploxP3aUPと相同組換えが起こったクローンを検出するためのサザンプロット用プローブとして、マウスCyp3aY領域のDNA断片 (約400塩基対) を用いた。このDNA断片は以下の条件でC57BL/6マウスDNAを鋳型としてPCR増幅して得た。

#### 【0169】

センスプライマー ; 5'-ACGGTTTATGCATGCTAGGTG-3' (配列番号68)

アンチセンスプライマー ; 5'-TCCATGACAATAAGGCTGCC-3' (配列番号69)

#### 【0170】

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp9600を、TaqポリメラーゼはLA Taq (宝酒造) を用い、バッファーやdNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は、85℃ 3分、94℃ 1分の熱変性後、98℃ 10秒、65℃ 30秒、72℃ 1分を1サイクルとして35回サイクル行った。

#### 【0171】

上記プローブ (プローブの標識には、アマシャム社のメガプライムDNAラベリングシステムを用いた) を用いたサザンプロット解析により、相同組換え体を検出した。その結果、144クローン中1クローンが相同組換え体であった。野生型T2F細胞ではHindIII消化により約10kbの位置にバンドが検出された。相同組換え体においてはこのバンドが消失し、新たに約5kbの位置にバンドが検出された。このことから相同組換えにより目的の部位にloxP配列が挿入されたことが確認さ

れた。

【0172】

【実施例9】相同組換え体ES細胞（ES/loxP3aUP）からのキメラマウス作製

実施例8で得られる相同組換え体TT2F細胞株（ES/loxP3aUP）を、ICRまたはMCH（ICR）（日本クレア）雌雄マウスの交配により得られる8細胞期胚に、胚あたり10～20個注入する。ES細胞培地（相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、羊土社、1995）で一晩培養して胚盤胞に発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親ICRマウスの子宮に、片側の子宮あたり約10個のインジェクション胚を移植することによってキメラマウスを作製し、実施例8で得られたTT2F細胞株（ES/loxP3aUP）がキメラ形成能を実際に保持しているかを確認する。

【0173】

【実施例10】マウスES細胞Cyp3a遺伝子クラスターの両端にloxP配列を挿入した細胞株の取得

実施例8で得られた相同組換え体ES/loxP3aUP（マウスCyp3a遺伝子クラスター中のCyp3aY遺伝子領域にloxP配列が挿入されたもの）に対して、ターゲティングベクターploxP3aDOWNを用いて上記と同様にトランスフェクションを行う。ただし、選択培養はピューロマイシン（シグマ）0.75μg/mlを含む培地中で約1週間行う。実施例8と同様にしてピューロマイシン耐性クローンからゲノムDNAを抽出してサザンハイブリダイゼーションにより相同組換え体（ES/loxP3aUP+DOWN）の同定を行う。

【0174】

【実施例11】相同組換え体ES細胞（ES/loxP3aUP+DOWN）からのキメラマウスの作製

実施例9と同様にして相同組換え体TT2F細胞株（ES/loxP3aUP+DOWN）を、ICRまたはMCH（ICR）（日本クレア）雌雄マウスの交配により得られる8細胞期胚に、胚あたり10～20個注入する。ES細胞培地（相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ8、ジーンターゲティング、羊土社、1995）で一晩培養して胚盤胞に発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親ICRマウスの子宮に、片側の子宮あたり約10個の

インジェクション胚を移植することによってキメラマウスを作製し、実施例10で得られたTT2F細胞株（ES/loxP3aUP+DOWN）がキメラ形成能を実際に保持しているかを確認する。

## 【0175】

## 【実施例12】マウスES細胞Cyp3a遺伝子クラスター欠失細胞株の取得

以上の2回のターゲティング実験により得られたES細胞株ES/loxP3aUP+DOWN（マウスCyp3a遺伝子クラスターの両末端にloxP配列が挿入されたもの）に対して、Cre組換え酵素発現ベクターpBS185（ギブコ）をトランスフェクションする。これによって、マウス内在性Cyp3a遺伝子クラスターの両末端に存在するloxP配列間で部位特異的組換えが起こり、結果的にCyp3a遺伝子クラスターが欠失すると期待できる。基本的な手順は上記の実施例8に従って行う。

## 【0176】

ES細胞株ES/loxP3aUP+DOWNをトリプシン処理し、 $2.5 \times 10^7$ 個/mlとなるようにHBSに懸濁してから、30μgのpBS185ベクターを加え、ジーンパルサーを用いて上記実施例8と同条件でエレクトロポレーションを行う。その後、100mmシャーレ1枚あたりに十分分離した数百のコロニーが出現するように播種する。期待通りのloxP間組換えが起こっている場合にはベクター中のGFP（Green Fluorescent Protein）遺伝子が発現し、蛍光発光によって検出可能と考えられる。FITC用フィルターを用いた蛍光顕微鏡で発光コロニーを同定する。あるいは、FACS（蛍光活性化セルソータ）により、GFP陽性細胞集団を分離する。その後、そのコロニーからゲノムDNAを抽出して実際に組換え体（ES/△3a）であることをサザンハイブリダイゼーションあるいは、PCRによって確認する。

## 【0177】

## 【実施例13】組換え体ES細胞（ES/△3a）からのキメラマウス作製

実施例9と同様にして組換え体TT2F細胞株（ES/△3a）を、ICRまたはMCH(ICR)（日本クレア）雌雄マウスの交配により得られる8細胞期胚に、胚あたり10~20個注入する。ES細胞培地（相沢慎一、バイオマニュアルシリーズ 8、ジーンターゲティング、羊土社、1995）で一晩培養して胚盤胞に発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親ICRマウスの子宮に、片側の子宮あたり約10個のインジェクショ

ン胚を移植することによってキメラマウスを作製し、実施例12で得られたTT2F細胞株(ES/△3a)がキメラ形成能を実際に保持しているかを確認する。

## 【0178】

## 【実施例14】トリDT40細胞へのヒト7番染色体の導入

富塚ら(Nature Genet., 16:133-143, 1997)の方法に従い、約 $10^8$ 個のヒト7番染色体を保持するマウスA9細胞H5からミクロセルを精製し、DMEM 5mlに懸濁した。1~ $2 \times 10^7$ 個のトリDT40細胞をDMEMで2回洗浄後、DMEM 5mlに懸濁し、遠心したミクロセルに加え、1500 rpmで10分間遠心し、上清を完全に取り除いた。沈殿をタッピングにより十分ほぐし、PEG1500溶液(ペーリング)0.5mlを加え、約2分間、十分攪拌した。その後、DMEM 10mlをゆっくり加え、1500 rpmで1分間遠心し、血清RPMI1640培地で培養した。24時間後、培地を1mg/mlのG418を含む培地に交換し、約3週間選択培養した。薬剤耐性コロニーからゲノムDNAを抽出してCYP3A4とMDR1を検出するためのプライマーを用いてPCRを行った。

## 【0179】

(CYP3A4及びMDR1検出用プライマー)

センス: 5'-CTCAGAAACTGTCAAGCATGC-3' (配列番号58)

アンチセンス: 5'-CCTAAAGGAAACGAACAGCG-3' (配列番号59)

## 【0180】

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp9600を、TaqポリメラーゼはEx Taq(宝酒造)を用い、バッファーやdNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は94℃1分の熱変性後、98℃10秒、56℃30秒、72℃30秒を1サイクルとして35サイクル行った。その結果、約30クローン中、2クローンがCYP3A4とMDR1陽性であった(データは示さない)。さらに、ヒトCOT1 DNAプローブを用いてFISHを行った結果、全長ヒト7番染色体が独立して存在していることが分かった(データは示さない)。以上の結果から、全長ヒト7番染色体を保持するトリDT40細胞がクローニングできた。

## 【0181】

## 【実施例15】カセットベクター-ploxPHyg、ploxPbsrの作製

ヒト染色体上にCre組換え酵素の認識配列であるloxP配列を挿入するためのカセットベクターploxP<sub>H</sub>yg、ploxP<sub>bsr</sub>を、以下のようにして作製した。尚、前述したように、期待通りの転座が起った細胞をポジティブセレクションできるよう前に、前者のカセットベクターにはPGKプロモータが、後者にはこのPGKプロモータによって転写されるべきGFP遺伝子が含まれるように構築した。

## 【0182】

まず、ploxP<sub>H</sub>ygの作製について述べる。プラスミドpBluescript II SK(-)（東洋紡）を制限酵素EcoRV（ペーリンガー）で切断し、脱リン酸化酵素CIAP（仔牛小腸由来アルカリ脱リン酸化酵素、宝酒造）を用いて、50℃で30分間反応し、切断末端を脱リン酸化した。これに、プラスミドpBS302（ギブコ）から制限酵素SphIとHindIII（ペーリンガー）で切り出してDNA Blunting kit（宝酒造）で平滑末端化したDNA断片を、DNA Ligation kit（宝酒造）を用いてライゲーションし、エシェリヒア・コリのコンピテントセルDH5（東洋紡）を形質転換した（プラスミドpBS302HS）。平滑末端化、ライゲーション及び形質転換は、各キットに添付のプロトコールに従って行った。

## 【0183】

次に、このプラスミドpBS302HSを制限酵素SalI（ペーリンガー）で切断、脱リン酸化し、これにプラスミドpGK<sub>Puro</sub>（WHITEHEAD INSTITUTE, Dr. Peter W. Lairdから分与）から制限酵素SalIとXbaI（ペーリンガー）で切り出したPGKプロモータ断片をクローニングし、プラスミドpBSPGK302HSを得た。このプラスミドを制限酵素EcoRIとNotI（ペーリンガー）で切断し、平滑化脱リン酸化後、NotIリンカー（宝酒造）をライゲーションした（プラスミドpBSPGK302HSN）。

## 【0184】

一方、プラスミド#1-133（京都大学医学部 武田俊一教授より分与）を制限酵素BamHI（ペーリンガー）で切断することによってハイグロマイシンB耐性遺伝子カセットを切り出し、末端を平滑化した。プラスミドpBSPGK302HSNを制限酵素SalI（ペーリンガー）で切断し平滑末端後、ハイグロマイシンB耐性遺伝子カセットをクローニングした（プラスミドploxP<sub>H</sub>yg）。

次に、ploxP<sub>bsr</sub>の作製について述べる。まず最初に、プラスミドpBluescript

II SK(-) (東洋紡) のSacI部位に上記のようにしてSfiIリンカーを挿入した。SfiIリンカーは、以下の配列のオリゴDNAを合成し、5'末端をリン酸化した（合成はグライナーに委託）。

## 【0185】

(SfiIリンカー)

5' -pGGCCGC [A/T] GCGGCC-3'

## 【0186】

このプラスミドを制限酵素BamHI (ベーリンガー) で切断、脱リン酸化し、これにプラスミドpBS302 (ギブコ) から制限酵素BamHI (ベーリンガー) で切り出したDNA断片をクローニングした (pBSSfK302B)。プラスミドpGREEN LANTERN-1 (ギブコ) のClaI部位に上記のようにSpeIリンカー (宝酒造) を挿入し、さらに制限酵素SpeI (ベーリンガー) で切り出すことによって得たGFP遺伝子カセット断片を、SpeIで切断後、脱リン酸化したプラスミドpBSSfK302Bにクローニングした (pBSSfK302BGFP)。このプラスミドを制限酵素XbaI (ベーリンガー) で切断し、平滑末端化後、プラスミド#1-134 (京都大学医学部 武田俊一教授より分与) から制限酵素BamHI (ベーリンガー) で切り出し平滑末端化したDNA断片 (プラスチサイジンS耐性遺伝子カセット) をクローニングした (ploxPbsr)。カセットベクター-ploxPHyg, ploxPbsrの構造を図8に示した。

## 【0187】

【実施例16】ターゲティングベクターpCenMDR1loxPHyg(F)、pCenMDR1loxPHyg(R)の作製

ヒト7番染色体上のMDR1遺伝子座の極セントロメア側に位置するゲノム領域（仮にCenMDR1と呼ぶ）にloxP配列を挿入するためのターゲティングベクターpHCF2loxPHyg(F)、pCenMDR1loxPHyg(R)を以下のようにして作製する。CenMDR1のシークエンス方向がセントロメア→テロメアか、テロメア→セントロメアかが不明のため、(F), (R)の2方向のターゲティングベクターを作製する。

## 【0188】

まず、ヒトCenMDR1ゲノム領域を適当なプライマーを用いてPCRにより増幅する。この際に、増幅されるPCR産物をベクターにクローニングできるように適当な

制限酵素の認識部位をプライマーの5'末端に付加しておく。PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp9600を、TaqポリメラーゼはLA Taq（宝酒造）を用い、バッファーやdNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いる。温度、サイクル条件は、94℃ 1分の熱変性後、98℃ 10秒、65~68℃ 15分を1サイクルとして35サイクル行う。PCR産物をプロテネースK（ギブコ）処理した後、CHROMA SPIN-TE400（クローンテック）でゲルfiltrationする。その後、プライマーに付加した認識部位を切断する制限酵素で切断し、CHROMA SPIN-TE1000（クローンテック）でゲルfiltrationする。このPCR断片をプラスミドpBluescriptIIにクローニングする（pCenMDR1）。

#### 【0189】

次に、カセットベクターploxPHygから制限酵素KpnIとNotI（ベーリンガー）でloxPを含むDNA断片を切り出し平滑末端化後、プラスミドpCenMDR1にクローニングする。loxP配列の方向がクローニングしたCenMDR1ゲノム断片と同方向のものを(F)、逆方向のものを(R)とする[pCenMDR1loxPHyg(F), (R)、図9]。

#### 【0190】

##### 【実施例17】カセットベクターpTELPuroの作製

ヒト染色体上にヒトテロメア配列を挿入するためのカセットベクターpTELPuroを、以下のようにして作製した。ヒトテロメア配列は、J.J.Harringtonら（Nature Genet., 15, 345-355, 1997）にならってPCRにより合成し、プラスミドpBluescript II SK(-)（東洋紡）のEcoRV部位にクローニングした（pTEL）。次にプラスミドpGKPuro（WHITEHEAD INSTITUTE, Dr. Peter W. Lairdから分与）のEcoRI部位をNotI部位に変え、制限酵素NotI（ベーリンガー）で切り出したDNA断片（ピューロマイシン耐性遺伝子カセット）をプラスミドpTELのNotI部位にクローニングした（pTELPuro、図10）。

#### 【0191】

##### 【実施例18】ターゲティングベクターpTELPuroCYP3ATel(F)、pTELPuroCYP3ATel(R)の作製

ヒト7番染色体上のCYP3A遺伝子座クラスターの極テロメア側に位置するゲノム領域（仮にCYP3ATelと呼ぶ）にヒトテロメア配列を挿入するためのターゲティング

ゲベクターpTELPuroCYP3ATel(F)、pTELPuroCYP3ATel(R)を以下のようにして作製する。CYP3ATelゲノム領域のシークエンス方向がセントロメア→テロメアか、テロメア→セントロメアかが不明のため、(F)、(R)の2方向のターゲティングベクターを作製する。

#### 【0192】

まず、ヒトCYP3ATelゲノム領域を適當なプライマーを用いてPCRにより増幅する。この際に、増幅されるPCR産物をベクターにクローニングできるように適當な制限酵素の認識部位をプライマーの5'末端に付加しておく。PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp9600を、TaqポリメラーゼはLA Taq(宝酒造)を用い、バッファーやdNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)は添付のものを推奨条件に従って用いる。温度、サイクル条件は、94°C 1分の熱変性後、98°C 10秒、65~68°C 15分を1サイクルとして35サイクル行う。PCR産物をプロテネースK(ギブコ)処理した後、CHROMA SPIN-TE400(クローンテック)でゲル濾過する。その後、プライマーに付加した認識部位を切断する制限酵素で切断しCHROMA SPIN-TE1000(クローンテック)でゲル濾過する。このPCR断片をプラスミドpTELPuroにクローニングする。クローニングされたCYP3ATelゲノム断片がヒトテロメア配列と同方向のものを(F)、逆方向のものを(R)とする[pTELPuro CYP3ATel (F), (R)、図11]。

#### 【0193】

【実施例19】トリDT40細胞中のヒト7番染色体の部位特異的切断  
上記実施例14で得られたヒト7番染色体断片を保持するトリDT40細胞に上記実施例18で作製したターゲティングベクターpTELPuro CYP3ATel (F), (R)をトランスフェクションし、CYP3ATelゲノム領域にヒトテロメア配列を挿入することによって、その挿入部位で7番染色体を切断することを試みる。

#### 【0194】

上記と同様にして、適當な制限酵素で線状化したターゲティングベクターpTELPuro CYP3ATel (F), (R)をトランスフェクションし、ピューロマイシン(0.3 mg/ml)存在下で約2週間選択培養する。耐性クローンからゲノムDNAを抽出して適當なプライマーを用いてPCRにより相同組換え体の同定を行う(図11)。PCRは

、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp9600を、TaqポリメラーゼはLA Taq（宝酒造）を用い、バッファーやdNTP（dATP, dCTP, dGTP, dTTP）は添付のものを推奨条件に従って用いる。温度、サイクル条件は、94℃ 1分の熱変性後、98℃ 10秒、68℃ 10分を1サイクルとして35サイクル行う。この実験により予想通りのPCR産物が増幅されたクローニングを相同組換え体とする（仮に、それぞれ3AF、3ARクローニングと呼ぶ）。

次に、相同組換え体3AF、3ARクローニングにおいて、CYP3Atelゲノム領域で7番染色体の切断が起こっているか否かを、PCR及びFISH解析によって調べる。

### 【0195】

#### (1) PCR解析

7番染色体上の遺伝子及び多型マーカーの存在（図12）を、例えば以下のプライマーを用いてPCRにより検出する。D7S664、D7S634、D7S648、D7S505検出用のプライマーはBIOS社のものを用いる。CYP3A4検出用プライマーは上記（配列番号1、2）の配列を用いる。PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp9600を、TaqポリメラーゼはEx Taq（宝酒造）を用い、バッファーやdNTP（dATP, dCTP, dGTP, dTTP）は添付のものを推奨条件に従って用いる。温度、サイクル条件は、94℃ 1分の熱変性後、98℃ 10秒、56～60℃ 30秒、72℃ 30秒を1サイクルとして35サイクル行う。この実験によりCYP3Atelゲノム領域よりもテロメア側に位置するマーカーが全て消失し、セントロメア側のマーカーは全て検出されていることを確認する。

### 【0196】

#### (2) FISH解析

ヒト7番染色体がCYP3Atelゲノム領域で切断されていることを視覚的に判断するため、ターゲティングベクター中のピューロマイシン耐性遺伝子を検出できるpGKpuroプローブを用いたFISHを行う。方法は、黒岩ら（Nucleic Acid Research, 26:3447-3448, 1998）に従う。COT1染色（ローダミン標識、赤色）により7番染色体が断片化していることを確認する。さらに、pGKpuroプローブ由来のシグナル（FITC標識、黄色）がテロメアの一端に検出されることを確認する。

以上の実験から、相同組換え体において、ヒト7番染色体がCYP3Atelゲノム領

域で切断されていると結論できる。

【0197】

【実施例20】トリDT40細胞中でのloxPPhygカセットのヒト7番染色体上への部位特異的挿入

上記実施例19で得られるCYP3A<sub>tel</sub>ゲノム領域で切断されたヒト7番染色体断片を保持するトリDT40細胞に、上記実施例16で作製したターゲティングベクター-pCenMDR1loxPPhyg(F), (R)をトランスフェクションし、CenMDR1ゲノム領域にloxPPhygカセットを挿入することを試みる。

【0198】

トリDT40細胞の培養は、10%ウシ胎児血清（ギブコ、以下FBSで記す）、1%ニワトリ血清（ギブコ）、 $10^{-4}$ M 2-メルカプトエタノール（シグマ）を添加したRPMI1640培地（ギブコ）中で行う。約 $10^7$ 個の細胞を無添加RPMI1640培地で一回洗浄し、0.5 mlの無添加RPMI1640培地に懸濁し、適当な制限酵素で線状化したターゲティングベクター-pCenMDR1loxPPhyg(F), (R)を25~30 mg加え、エレクトロポレーション用のキュベット（バイオラッド）に移し、室温で10分間静置する。キュベットをジーンパルサー（バイオラッド）にセットし、550 V, 25 mFの条件で電圧印加する。室温で10分間静置後、24時間培養する。24時間後、培地をハイグロマイシンB（1 mg/ml）を含む培地に交換し、96穴培養プレート5枚に分注して約2週間の選択培養を行う。ハイグロマイシンB耐性クローンから、Puregene DNA Isolation Kit (Gentra System社) を用いてゲノムDNAを抽出する。適当なプライマーを用いてPCRにより相同組換え体の同定を行う（図9）。

【0199】

PCRは、~~サマーマルサイクラー~~としてPerkin-Elmer社製のGeneAmp9600を、TaqボリメラーゼはLA Taq（宝酒造）を用い、バッファーやdNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いる。温度、サイクル条件は、94°C 1分の熱変性後、98°C 10秒、65°C 5分を1サイクルとして35サイクル行う。この実験により、予想通りのPCR産物が増幅されたクローンを相同組換え体とする（仮にMF, MRクローンと呼ぶ）。

【0200】

## 【実施例21】ターゲティングベクターpRNR2loxPbsrの作製

ヒト14番染色体上のRNR2遺伝子座にloxP配列を挿入するためのターゲティングベクターpRNR2loxPbsrを、以下のようにして作製した。まず、ヒトRNR2遺伝子座のゲノム領域を以下のプライマーを用いてPCRにより増幅した。

## 【0201】

(RNR2遺伝子領域増幅用プライマー)

センス : 5'-TCGAGAATTCACTAGCTGGCACTATCTTTTGGCCATC-3' (配列番号60)

アンチセンス : 5'-TCGAGAATTCCGGAGAAAGAACACACAAGGACTCGGTC-3' (配列番号61)

## 【0202】

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp9600を、TaqポリメラーゼはLA Taq (宝酒造) を用い、バッファーやdNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は94°C 1分の熱変性後、98°C 10秒、68°C 15分を1サイクルとして35サイクル行った。PCR産物をプロテネースK (ギブコ) 処理した後、CHROMA SPIN-TE400 (クローンテック) でゲル濾過した。その後、制限酵素EcoRI (ベーリンガー) で切断しCHROMA SPIN-TE1000 (クローンテック) でゲル濾過した。一方、プラスミドpBluescript IIのKpnI部位を制限酵素KpnI (ベーリンガー) で切断後、平滑化、セルフライゲーションすることにより欠失し、さらにNotI部位にSrfIリンカーを挿入したプラスミドベクター[pBS(K)Sr]を作製した。尚、SrfIリンカーには以下の配列のオリゴDNAを用いた。

## 【0203】

(SrfIリンカー)

5'-pGGGGGGGG-3'

## 【0204】

プラスミド[pBS(K)Sr]のEcoRI部位に、上記のRNR2遺伝子PCR断片をクローニングすることで、プラスミドpRNR2を作製した。一方、カセットベクターploxPbsrのSfiI部位にKpnIリンカー (宝酒造) を挿入し、制限酵素KpnI (ベーリンガー) でloxP配列を含むDNA断片を切り出し、プラスミドpRNR2のKpnI部位にクローニングした。RNR2遺伝子は、テロメア→セントロメア方向に転写される (R.G.Worton

ら、SCIENCE, 239:64-68, 1988) ことが報告されているので、クローニングしたRNR2遺伝子PCR断片の方向とloxP配列の方向とが逆向きのものを、ターゲティングベクターとして用いた(pRNR2loxPbsr、図13)。

## 【0205】

【実施例22】トリDT40細胞中でのloxPbsrカセットのヒト14番染色体上への部位特異的挿入

ヒト14番染色体断片SC20を保持するトリDT40細胞（鳥取大学医学部 押村教授より分与）に上記実施例21で作製したターゲティングベクターpRNR2loxPbsrをトランスフェクションし、RNR2遺伝子座にloxPbsrカセットを挿入することを試みた。

## 【0206】

上記と同様にして、制限酵素SrfI（東洋紡）で線状化したターゲティングベクターpRNR2loxPbsrをトランスフェクションし、プラストサイジンS (10 mg/ml) 存在下で約2週間選択培養した。耐性クローンからゲノムDNAを抽出して以下のプライマーを用いてPCRにより相同組換え体の同定を行った（図13）。

## 【0207】

（相同組換え体同定用プライマー）

センス (RNR2-1) : 5'-TGGATGTATCCTGTCAAGAGACC-3' (配列番号62)

アンチセンス (STOP-3) : 5'-CAGACACTCTATGCCTGTGTGG-3' (配列番号63)

## 【0208】

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp9600を、TaqポリメラーゼはLA Taq（宝酒造）を用い、バッファーやdNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いた。温度、サイクル条件は、94°C 1分の熱変性後、98°C 10秒、65°C 5分を1サイクルとして35サイクル行った。この結果、60クローン中8クローンにおいて予想通りの約2.5 kbのPCR産物が増幅され、相同組換え体が得られた（Rクローンと呼ぶ）。

## 【0209】

【実施例23】ヒトCYP3A遺伝子クラスターとMDR遺伝子クラスターの両方を有するヒト人工染色体#7-HACの構築

一般的記載で記したように、マウス中でより安定にかつ効率良く完全なヒトCY P3A遺伝子群、MDR遺伝子群を発現させるために、CenMDR1-MDR1-CYP3A4-CYP3A4te 1から成るヒト7番染色体断片をヒト14番染色体断片SC20上のRNR2遺伝子座に転座させることによって、ヒトCYP3A遺伝子クラスターとMDR遺伝子クラスターの両方を有するヒト人工染色体#7-HACを構築することを試みる。

#### 【0210】

まず、最初に上記実施例20で得られる相同組換え体MF、MRクローンを相同組換え体Rクローンと細胞融合することによって、ヒト7番染色体断片と14番染色体断片SC20断片の両者を保持するDT40ハイブリッドを作製する。

#### 【0211】

(1) ヒト7番染色体断片と14番染色体断片SC20断片の両者を保持するDT40ハイブリッドの作製

Rクローンはblastozin S (10 mg/ml) 含有RPMI1640培地で、MFクローンはハイグロマイシンB (1 mg/ml) 含有RPMI1640培地で培養する。1~2×10<sup>7</sup>個の両クローンを混合し遠心後、無血清RPMI1640培地で2回洗浄する。残量培地を完全に取り除いた後に、予め37℃で保温しておいた50% PEG 1500 (ベーリンガー) 0.5 mlを静かに加え、約2分間ピペットで激しく混合する。その後、無血清RPMI 1640培地1 mlを1分間かけてゆっくり加え、続いて無血清RPMI1640培地9 mlを約3分間かけて加え、37℃で10分間静置する。その後、1,200 rpmで5分間遠心し、血清を含むRPMI1640培地で24~48時間培養する。

#### 【0212】

その後、blastozin S (10 mg/ml)、ハイグロマイシンB (1 mg/ml) 含有RPMI1640培地に交換し、24穴培養プレート5枚に分注し、3~4週間培養する。

同様にして、MRクローンとRクローンも細胞融合する。MFクローンとRクローンとの細胞融合から得られたハイブリッド (RMFクローンと呼ぶ)、MRクローンとRクローンとの細胞融合から得られたハイブリッド (RMRクローンと呼ぶ) からゲノムDNAを抽出して、以下のプライマーを用いてPCRを行い、ヒト14番、7番染色体の2本が保持されていることを確認する。

#### 【0213】

(ヒト14番染色体検出用プライマー)

センス : 5'-AGTGAGATAAGCAGTGGATG-3' (配列番号64)

アンチセンス : 5'-GTTGTGCTACTCCCATCACT-3' (配列番号65)

## 【0214】

ヒト7番染色体検出用プライマーは、上記（配列番号1, 2）の配列を用いる。PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp9600を、TaqポリメラーゼはEx Taq（宝酒造）を用い、バッファーやdNTP（dATP, dCTP, dGTP, dTT P）は添付のものを推奨条件に従って用いる。温度、サイクル条件は、94℃1分の熱変性後、98℃ 10秒、56℃ 30秒、72℃ 30秒を1サイクルとして35サイクル行う。この実験により、上記2組のプライマーにおいてPCR産物が得られることを確認する。さらに、ヒトCOT1 DNAをプローブに用いてFISHを行い、2本のヒト染色体を独立した状態で保持していることを確認する。以上の実験から、RMF、RMRハイブリッドクローニングは、ヒト14番、7番染色体の2本を保持していると結論できる。

## 【0215】

(2) RMF、RMRハイブリッドクローニングにおけるヒト7番染色体断片の14番染色体断片SC20への部位特異的転座

## (2)-1 Cre組換え酵素安定発現ベクターpBS185hisDの構築

一般記載で記したように、ヒト染色体の部位特異的転座はCre-loxPシステムを用いることによって行う。このシステムにおいても、今回のように非相同染色体間での組換え効率は非常に低いことが予想されるため、Cre酵素を一過性ではなく安定発現させることを考え、以下のような発現ベクターpBS185hisDを構築した（図14）。

## 【0216】

Cre組換え酵素発現ベクターpBS185（ギブコ）を制限酵素EcoRI（ベーリンガー）で切断し、BglIIリソマリーゼを挿入した（pBS185Bgl）。一方、ヒスチヂノール耐性遺伝子カセットを含むプラスミド#1-132（京都大学医学部 武田俊一教授より分与）から、制限酵素BamHI（ベーリンガー）でヒスチヂノール耐性遺伝子カセットを切り出し、pBS185BglのBglII部位にクローニングした（pBS185hisD）。

## 【0217】

(2)-2 Cre-1 xPシステムを用いたRMF, RMRハイブリッドクローンにおけるヒト  
7番染色体断片の14番染色体断片SC20への部位特異的転座

上記と同様にして、制限酵素KpnI（ペーリンガー）で線状化したCre組換え酵素安定発現ベクターpBS185hisDを、RMF、RMRハイブリッドクローンにそれぞれトランスフェクションし、ヒスチヂノール（0.5 mg/ml）存在下で約2週間選択培養する。その後、6穴培養プレート4枚に耐性細胞集団を分注し（24プール）、任意に2プールを選んで約107個になるまで培養する。細胞プールを5% FBSと1 mg/mlのプロピディアムアイオダイド（PI）を添加したPBS（リン酸緩衝溶液）4mlに懸濁し、FACSVantage（ベクトン・ディッキンソン）により解析する。前述したように、loxP間での組換え転座が起こるとGFP遺伝子が再構築され発現するので、転座を起こした細胞をFACSで検出できる。GFP陽性と思われる細胞画分のソーティングを数回繰り返すことによって、GFP陽性細胞をクローニングする。

## 【0218】

次に、FACSでクローニングされたクローンにおいて、期待通りloxP間で組換えが起こっていることをPCRによって確認する。ゲノムDNAを抽出して以下のプライマーを用いてPCRを行う。

## 【0219】

（組換え検出用プライマー）

- センス(PGK) : 5'-ATAGCAGCTTGCTCCTTCG-3' (配列番号66)
- アンチセンス(GFP) : 5'-TTCTCTCCTGCACATAGCCCC-3' (配列番号67)

## 【0220】

PCRは、サーマルサイクラーとしてPerkin-Elmer社製のGeneAmp9600を、TaqポリメラーゼはEx Taq（宝酒造）を用い、バッファーやdNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) は添付のものを推奨条件に従って用いる。温度、サイクル条件は、94°C 1分の熱変性後、98°C 10秒、61°C 30秒、72°C 1分を1サイクルとして35サイクル行う。図15に示すように、このプライマーで約600 bpのPCR産物が得られれば、loxP間で組換えが起こっていることが示唆される。さらに、GFP陽性クローンに対して、ヒト14q ter特異的プローブ（ヒト14番染色体長腕テロメア領域を

検出、FITC標識）とpGKPuroプローブ（ヒト7番染色体断片の長腕テロメア領域を検出、ローダミン標識）を用いたFISHを行い、同一染色体上の両末端テロメア領域にFITCシグナルとローダミンシグナルが検出されることを確認する。また、  
 ヒト14番染色体特異的プローブとヒト7番染色体特異的プローブでFISHを行い  
 、同一染色体上に両方のプローブ由来のシグナルが観察されることを確認する。

## 【0221】

以上の実験から、GFP陽性クローンにおいて期待通りの転座が起こり、同一染色体上にヒトCYP3A遺伝子クラスターとMDR遺伝子クラスターの両方が含まれる人工染色体#7-HACが構築されたと結論できる。

## 【0222】

【実施例24】DT40ハイブリッド細胞からのヒト人工染色体#7-HACのチャイニーズハムスターCHO細胞へのMMCT

マウスES細胞へヒト人工染色体#7-HACを導入するために、まず、CHO細胞へMMCTにより導入する。

## 【0223】

上記GFP陽性 DT40ハイブリッドをそれぞれ直径150 mmシャーレ8枚で培養し、コンフルエントになった時点で20% FBS、1%ニワトリ血清、 $10^{-4}$  M 2-メルカプトエタノール、0.05 mg/mlコルセミドを添加したRPMI1640培地に交換し、さらに36時間培養してミクロセルを形成させる。細胞を24 mlの血清RPMI1640培地に懸濁し、予め100 mg/mlのポリL-リジンでコートした遠心用25 cm<sup>3</sup>フラスコ12本（コーニング）に2 mlずつ分注し、37°Cで1時間培養し、細胞をフラスコの底に付着させる。

## 【0224】

培養液を除去し、予め37°Cで保温したサイトカラシンB（10 mg/ml、シグマ）溶液を遠心用フラスコに満たし、34°C、8000 rpmで1時間の遠心を行う。ミクロセルを無血清DMEM培地に懸濁し、8 μmフィルター及び5 μmフィルターにて精製する。精製後、1700 rpmで10分間遠心し、無血清DMEM培地5 mlに懸濁する。一方、約10<sup>7</sup>個のCHO細胞をトリプシン処理によりはがし、無血清DMEM培地で2回洗浄し、無血清DMEM培地5 mlに懸濁する。再度、ミクロセルを1700 rpmで10分間遠心し

、上清を除かずに先のCHO懸濁液5 mlを静かに重層する。遠心後、培養液を除去し、1:1.4 PEG溶液 [5 g PEG1000 (和光純薬)、DMSO (シグマ) 1 mlをDMEM 6 mlに溶解] 0.5 mlを加え、約2分間ピペットで激しく攪拌する。その後、無血清DMEM培地10 mlを約3分間かけてゆっくり加え、37°Cで10分間静置する。遠心後、10% FBS添加F12培地 (ギブコ) に細胞を懸濁し、24穴培養プレート10枚に分注し、37°Cで24時間培養する。その後、G418 800 mg/ml含有F12培地に交換し、3~4週間選択培養する。

## 【0225】

G418耐性クローンからゲノムDNAを抽出してCYP3A4とVH3検出用プライマーを用いて、前述と同様の条件でPCRを行う。さらに、ヒト14番染色体、7番染色体特異的プローブを用いてFISHを行う。これらの結果から、目的のヒト人工染色体#7-HACを保持するCHO細胞クローンが得られたと結論できる。

## 【0226】

【実施例25】CHO細胞からの#7-HACのマウスES細胞へのMMCT  
#7-HACを保持するキメラマウスを作製するために、上記実施例24で得られた#7-HACを保持するCHO細胞からマウスES細胞へMMCTにより導入する。

## 【0227】

富塚ら (Nature Genet., 16:133-143, 1997) の方法に従い、約 $10^8$ 個の#7-HACを保持するCHO細胞からミクロセルを精製し、DMEM 5 mlに懸濁する。約 $10^7$ 個のマウスES細胞TT2Fをトリプシン処理により剥がし、DMEMで3回洗浄後、DMEM 5 mlに懸濁し、遠心したミクロセルに加え、1250 rpmで10分間遠心し、上清を完全に取り除く。沈殿をタッピングにより十分ほぐし、1:1.4 PEG溶液 [5g PEG 1000 (和光純薬)、1 ml DMSO (シグマ) をDMEM 6 mlに溶解] 0.5 mlを加え、約1分30秒間、十分攪拌する。その後、DMEM 10 mlをゆっくり加え、1250 rpmで10分間遠心し、30 mlのES培地に懸濁し、予めフィーダー細胞をまいた直径100 mmシヤーレ (コーニング) 3枚に分注し、培養する。24時間後、300 mg/mlのG418を含む培地に交換し、約1週間選択培養する。薬剤耐性コロニーからゲノムDNAを抽出してCYP3A4とVH3検出用プライマーを用いて、前述と同様の条件でPCRを行う。さらに、ヒト14番染色体、7番染色体特異的プローブを用いてFISHを行う。

これらの結果から、目的のヒト人工染色体#7-HACを保持するES細胞クローンが得られたと結論できる。

## 【0228】

## 【実施例2-6】ヒト人工染色体#7-HACを保持するキメラマウスの作製

上記実施例2-5で選られるES細胞クローンをICRまたはMCH（日本クレア）雌雄マウスの交配により得られる8細胞期胚に胚あたり10~12個注入する。ES細胞用培地で一晩培養して胚盤胞に発生させた後、偽妊娠処理後2.5日の仮親ICRマウスの子宮に、片側の子宮あたり約10個のインジェクション胚を移植し、キメラマウスを作製する。

## 【0229】

## 【発明の効果】

本発明は、以下に示す効果を奏する。

- (1) ヒトP450遺伝子群を染色体レベルの大きさで導入したキメラ非ヒト哺乳動物を作製することにより、個体内でヒトP450を発現するマウスを提供することができる。
- (2) ヒトP450遺伝子群を染色体レベルの大きさで導入したキメラ非ヒト哺乳動物は、P450遺伝子をヒトにおける発現の主要な臓器である肝臓ならびに小腸に特異的に発現し、ヒトにおける薬物代謝に関する組織特異性を非ヒト哺乳動物個体内で再現することができる。
- (3) また、本発明の非ヒト哺乳動物は、ヒトP450遺伝子群を染色体レベルの大きさで導入しているため、発現の調節に必要な遺伝子配列もこれに含まれていると考えらる。このため、キメラ非ヒト哺乳動物では、ヒトのP450の発現を誘導する薬剤で非ヒト哺乳動物個体内においてヒトP450の発現を誘導できる。

## 【0230】

- (4) キメラ非ヒト哺乳動物に限らず、その子孫についても上記の効果が得られるものと考えられる。
- (5) さらに、カウンターパートとなる非ヒト哺乳動物内在性P450遺伝子が破壊されたノックアウト非ヒト哺乳動物は、ヒトP450遺伝子の機能について重要な知見を提供できるばかりでなく、これとヒトP450遺伝子群を導入した非ヒト哺乳動物

あるいはその子孫と交配させてできた産仔では、特定のP450分子種に関して完全にヒト型化していると考えられる。よって、発現の組織特異性や薬物誘導また発現の割合だけでなく、代謝の機能についても特定のP450分子種に関して完全にヒト型化したヒトP450導入非ヒト哺乳動物を提供できると考えられる。

(6) この特定のP450分子種に関して完全にヒト型化したヒトP450導入非ヒト哺乳動物を用いれば、薬理効果や薬物代謝あるいは毒性といった薬物のヒトへの影響を実際にヒトに投与することなく研究あるいは予測することが可能である。

#### 【0231】

(7) キメラ非ヒト哺乳動物やその子孫または完全にヒト型化したヒトP450導入非ヒト哺乳動物の個体や、その組織、細胞から生物学的活性のあるヒトP450タンパクを得ることが可能である。このようなタンパクは、従来入手の困難なヒトP450タンパクを容易に提供できるばかりか、大腸菌に代表される細菌を用いた発現系では解決し得なかったリン酸化や糖鎖による修飾などに代表されるタンパクの修飾の面でもよりヒトの体内で生産されるP450に近いものを提供できる。

(8) また、上記非ヒト哺乳動物由来の組織や細胞を不死化して培養系で用いる場合、安定してヒトP450タンパクを供給できる。さらに、ヒトにおける薬物代謝の培養系における研究材料として利用が可能である。

#### 【0232】

##### 【配列表】

##### SEQUENCE LISTING

<110> 麒麟麦酒株式会社

<120> ヒトチトクロームP450遺伝子導入マウス

<130> P-6503

<140>

<141> 1999-08-13

<160> 69

<170> PatentIn Ver. 2.0

---

【0233】

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
detecting CYP3A4

<400> 1

gtctgtctgg gtttggaaagg

20

【0234】

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
detecting CYP3A4

<400> 2

tctgtgttgc tcttgctgg

20

【0235】

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

---

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
detecting CYP3A5

<400> 3

atagaagggt ctgtctggct gg

22

[0 2 3 6]

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
detecting CYP3A5

<400> 4

tcagctgtgt gctgttgttt gc

22

[0 2 3 7]

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
detecting CYP3A7

<400> 5

accctgaaat gaagacggc

20

[0238]

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
detecting CYP3A7

<400> 6

gagttaatgg tgcttaactgg gg

22

[0239]

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
detecting CYP3A cDNA

<400> 7

caagaccct ttgtggaaaa

20

【0240】

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
detecting CYP3A cDNA

<400> 8

tctgagcggt tcattcacca

20

【0241】

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
detecting CYP3A4 cDNA

<400> 9

gccatagaga caagggcaag

20

【0242】

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
detecting CYP3A4 cDNA

<400> 10

tcagtgaggc tggggattg 20  
[0 2 4 3]

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
detecting CYP3A5 cDNA

<400> 11

ctggtcaccc accatgtgt 20  
[0 2 4 4]

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
detecting CYP3A5 cDNA

<400> 12

tatcctctca cctgcccttg

20

[0 2 4 5]

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
detecting CYP3A11 cDNA

<400> 13

gacacaattg tcaaggatg g

21

[0 2 4 6]

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
detecting CYP3A11 cDNA

<400> 14

gctgacaaac aagcaggat

20

[0 2 4 7]

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
detecting CYP3A13 cDNA

<400> 15

atgtacctgc cctttgggag

20

**[ 0 2 4 8 ]**

---

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
detecting CYP3A13 cDNA

<400> 16

ggagtgggtt ttctgggtga

20

**[ 0 2 4 9 ]**

---

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
detecting CYP3A16 cDNA

<400> 17

tggtctccca tatctcaggc 20

【0250】

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
detecting CYP3A16 cDNA

<400> 18

caatgtacca gtgagagcgc 20

【0251】

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
detecting CYP3A25 cDNA

<400> 19

agaagaagag aaaggggagc c 21

【0252】

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
detecting CYP3A25 cDNA

<400> 20

cattcaccac catgtccagg

20

【0253】

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
detecting CYP3A25 cDNA

<400> 21

aaaccagaag aaccgagtg

20

【0254】

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for  
detecting CYP3A25 cDNA

<400> 22

gtgacaggta ccttattggg

20

[ 0 2 5 5 ]

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for  
clone 679

<400> 23

tagggtaaag acatgggtggc

20

[ 0 2 5 6 ]

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for  
clone 679

<400> 24

ggaggagagg gagatgttga t

21

【0257】

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for

clone 9736

<400> 25

agatgtgtgg ccttgttaag g

21

【0258】

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for

clone 9736

<400> 26

tttctggatg tcactggtcc

20

【0259】

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for

clone 29H12

<400> 27

tagaagccca actttgggac

20

[ 0 2 6 0 ]

<210> 28

---

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for

clone 29H12

<400> 28

agccaaacaag agggtgtacg

20

[ 0 2 6 1 ]

---

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer f r

CYP3A25

<400> 29

ggcctgaaact gctaaaggaa agcta

25

【0262】

<210> 30

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for

CYP3A25

<400> 30

ggtgaacatc cacaactacc attgag

26

【0263】

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for

clone 703

<400> 31

acagggagta ggtgacactg ttg

23

【0264】

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for

clone 703

<400> 32

gggttgttgg actcacagag ag

22

[0265]

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for

clone 703

<400> 33

gaccttacacac tggeaagaag tc

22

[0266]

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for  
clone 703

---

<400> 34

atggtgctca gcaatagtag gg

22

【0267】

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for  
clone 220H2

<400> 35

gcaggatacc agatatgtgg c

21

【0268】

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for  
clone 220H2

<400> 36

aaacccctta aaccacagc

20

【0269】

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: SP6 primer for  
clone 220H2

&lt;400&gt; 37

ggtgtcacac gcctttcatc

20

【0270】

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: SP6 primer for  
clone 220H2

&lt;400&gt; 38

ctgctcaaag gagaacaggg

20

【0271】

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for

clone 130A11

<400> 39

ccacacattc tgccaatcag

20

【0272】

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for

clone 130A11

<400> 40

agtacagcac cgggctaaag

20

【0273】

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer f r

clone 130A11

&lt;400&gt; 41

gcaacaataa cccaaactgcc

20

【0274】

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:SP6 primer for

clone 130A11

&lt;400&gt; 42

caggtggtaa taagctgcc

20

【0275】

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:T7 primer for

clone 29B19

&lt;400&gt; 43

gcatgaagca ctgtctcgtc

20

【0276】

&lt;210&gt; 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for  
clone 29B19

<400> 44

ggggtcctcc tttcaatatac c

21

【0277】

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for  
clone 29B19

<400> 45

tctctgccttc tcatacttagc c

21

【0278】

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for  
clone 29B19

---

<400> 46

tgtgtgtggg ttgggtgttc 20

【0279】

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for  
clone 173D23

<400> 47

cggctctcac aaatagaccc 20

【0280】

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for  
clone 173D23

<400> 48

ccaggttatac gctgggttttc 20

【0281】

<210> 49

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SP6 primer for  
clone 86H16

<400> 49

tcacgacctt atgcaaagac c

21

【0282】

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SP6 primer for  
clone 86H16

<400> 50

cggaaagtat tgctttcagc

20

【0283】

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for  
clone 86H16

<400> 51

tcagtcgtta ccagcccttt g

21

[ 0 2 8 4 ]

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for  
clone 86H16

<400> 52

gagtgggctc tggtcatttc

20

[ 0 2 8 5 ]

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for  
clone 204L9

<400> 53

tctcagcata gttcagggc

20

【0286】

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:SP6 primer for

clone 204L9

<400> 54

tttccttcag ctctgggtgg

20

【0287】

<210> 55

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:T7 primer for

clone 741

<400> 55

gttcctctgt aattctaatt tacatccact ggttcaaagg tctatgataa

50

【0288】

<210> 56

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SP6 primer for  
lambda DOWN12

<400> 56

ttcgggaggc cagtactatt c

21

[ 0 2 8 9 ]

<210> 57

---

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: SP6 primer for  
lambda DOWN12

<400> 57

cacacacgtc ttttggcag

20

[ 0 2 9 0 ]

<210> 58

---

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for

## CYP3A4 and MDR1

&lt;400&gt; 58

ctcagaaaact gtcaaggatg c

21

【0291】

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: primer for

CYP3A4 and MDR1

&lt;400&gt; 59

cctaaaggaa acgaacacgcg

20

【0292】

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: primer for

RNR2

&lt;400&gt; 60

tcgagaattcagtagctggcactatcttttggccatc

【0293】

<210> 61

<211> 37

<212> DNA

---

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
RNR2

<400> 61

tcgagaattc ggagaaaagaa cacacaagga ctccggtc

37

【0294】

<210> 62

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
identification of recombinant

<400> 62

tggatgtatc ctgtcaagag acc

23

【0295】

<210> 63

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
identification of recombinant

---

<400> 63

cagacactct atgcctgtgt gg

22

[0296]

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
detection of human chromosome 14

<400> 64

agtgagataa gcagtggttg

20

[0297]

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

---

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for  
detection of human chromosome 14

<400> 65

gttgtgctac tcccatca

20

【0298】

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: primer for

pgk

&lt;400&gt; 66

atagcagctt tgctcccttcg

20

【0299】

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: primer for

gfp

&lt;400&gt; 67

ttctctccctgcacatagcccc

20

【0300】

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for

Cyp3aY

<400> 68

acggtttatg catgcttaggt g

21

【0301】

<210> 69

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for

Cyp3aY

<400> 69

tccatgacaa taaggctgcc

20

【図面の簡単な説明】

【図1】 リファンピシン投与キメラマウスの肝臓由来のRNAを用いたRT-PCRの電気泳動写真。リファンピシンを投与したキメラマウスの肝臓でヒトCYP3A4が発現していることが示されている。

①、⑥：マーカー

②：リファンピシン投与マウス肝由来のPCR産物をEcoRI処理したもの

③：ヒト肝由来RNAのPCR産物をEcoRI処理したもの

④：リファンピシン投与マウス肝由来のPCR産物

⑤：ヒト肝由来RNAのPCR産物

【図2】 リファンピシン投与キメラマウスの各種臓器におけるヒトCYP3A4の発現を調べた結果を示す電気泳動写真 (RT-PCR)。肝臓および小腸でヒトCYP3A4が発現していることを示す。

①、⑧：マーカー

②：肝臓

③：小腸

④：腎臓

⑤：脾臓

⑥：肺

⑦：心臓

【図3】 マウスCyp3a11,13,16,25を含むBACクローンのコンティグ作製を示す。

【図4】 Cyp3a遺伝子クラスターの両端にloxP配列を挿入するためのカセットベクターploxPUP、ploxPDOWNの構造を示す図。

【図5】 マウスCyp3a領域へのターゲッティングのスキームを示す。

【図6】 マウスCyp3a遺伝子クラスターを欠失させるためのターゲティングベクターploxP3aUPの構造を示す図。

【図7】 マウスCyp3a遺伝子クラスターを欠失させるためのターゲティングベクターplox3aDOWNの構造を示す図。

【図8】 ヒト染色体上にloxP配列を挿入するためのカセットベクターploxPHyg、ploxPbsrの構造、及びを示す図。

【図9】 ヒト7番染色体上のMDR1遺伝子座の極セントロメア側に位置するゲノム領域 (CenMDR1) にloxP配列を挿入するためのターゲティングベクターpHC-F2loxPHyg(F)、pCenMDR1loxPHyg(R)の構造、及び相同組換え体の同定を示す図。

【図10】 ヒト染色体上にヒトテロメア配列を挿入するためのカセットベクターpTELPuroの構造を示す図。

【図11】 ヒト7番染色体上のCYP3A遺伝子座クラスターの極テロメア側に位置するゲノム領域 (CYP3Atel) にヒトテロメア配列を挿入するためのターゲティングベクターpTELPuroCYP3ATEl(F)、pTELPuroCYP3ATEl(R)の構造、及び相同組

換え体の同定を示す図。

【図12】 ヒト7番染色体上の遺伝子及び多型マーカの存在、及びヒト人  
工染色体#7-HACの構築を示す図。

【図13】 ヒト14番染色体上のRNR2遺伝子座にloxP配列を挿入するため  
のターゲティングベクターpRNR21loxPbsrの構造、及び相同組換え体の同定を示す  
図。

【図14】 Cre組換え酵素安定発現ベクターpBS185hisDの構造を示す図。

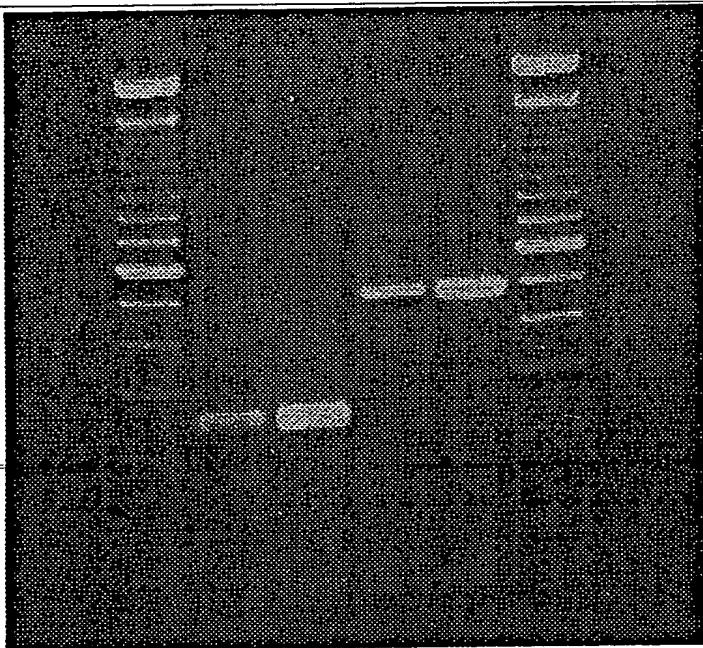
【図15】 ヒト7番染色体断片の14番染色体断片SC20への部位特異的転  
座の検出を示す図。

【図16】 #7-HACを保持するキメラマウスの作製の概略を示す図。

【書類名】 図面

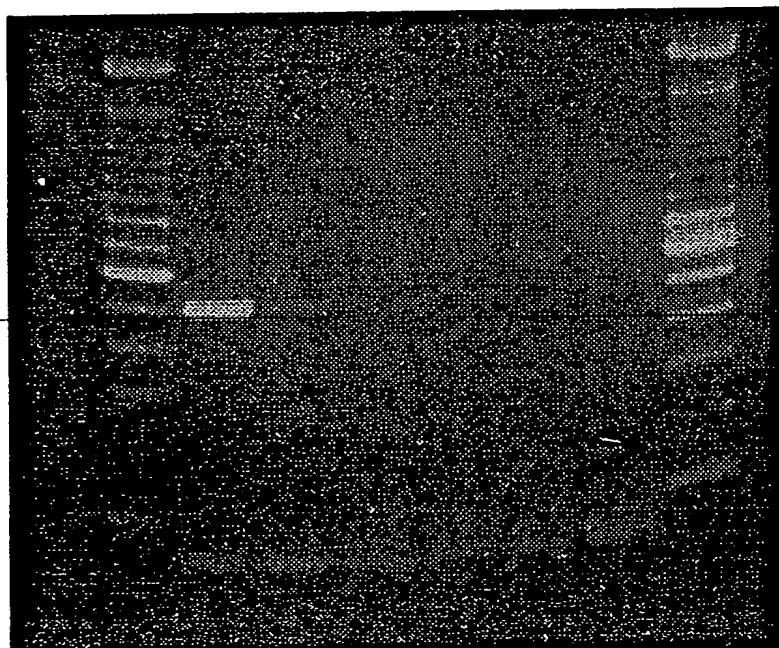
【図1】

① ② ③ ④ ⑤ ⑥

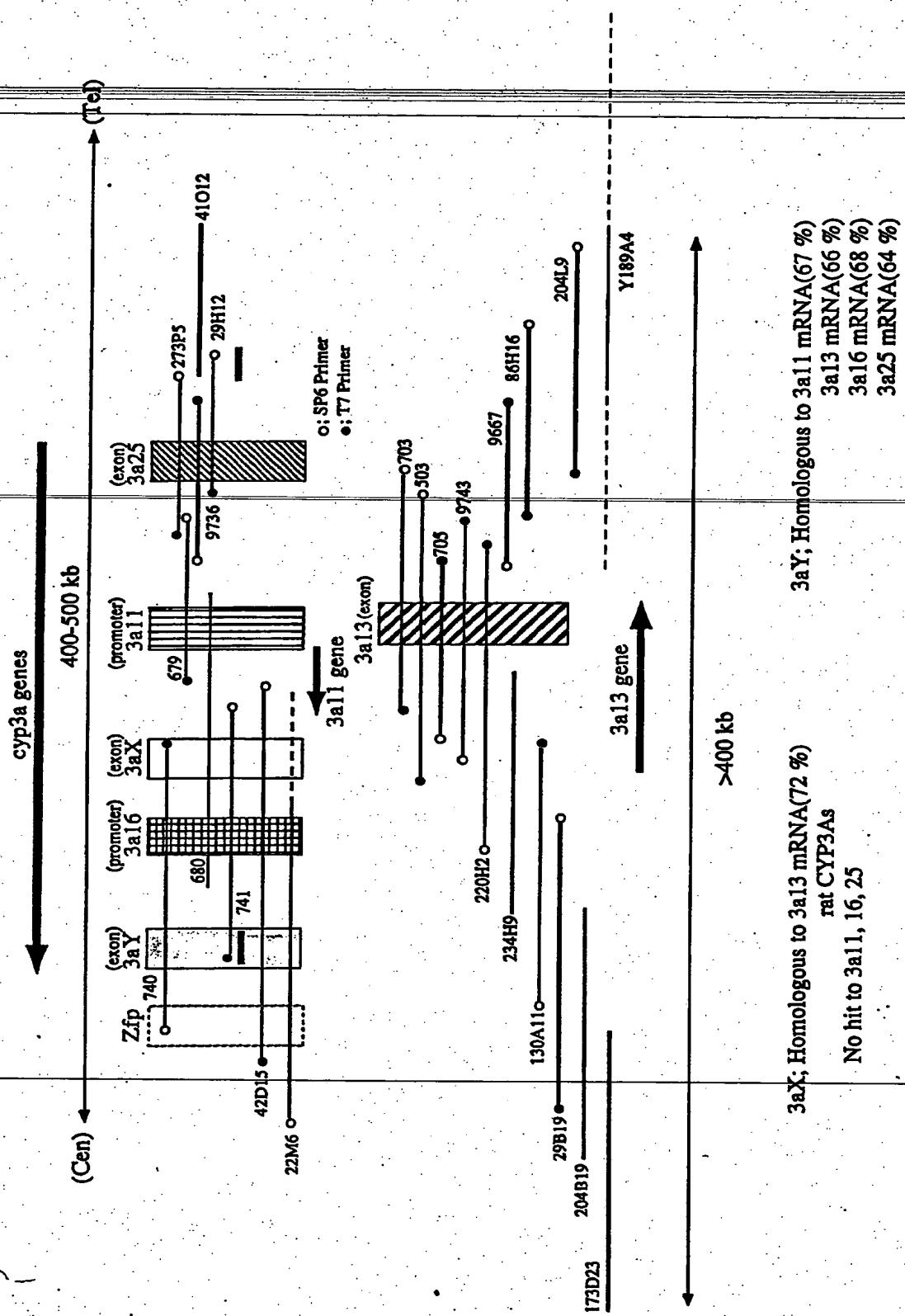


【図2】

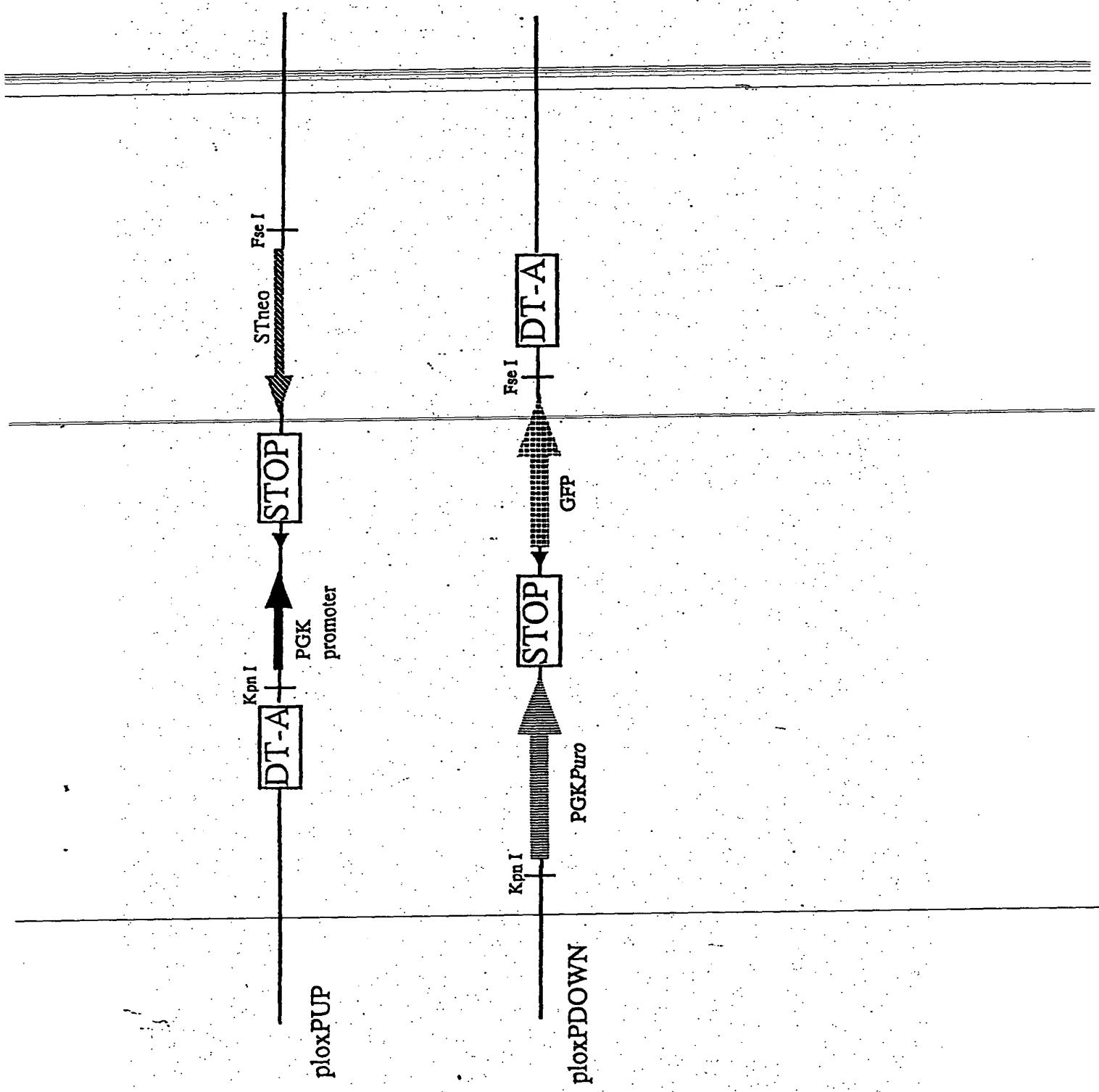
① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧



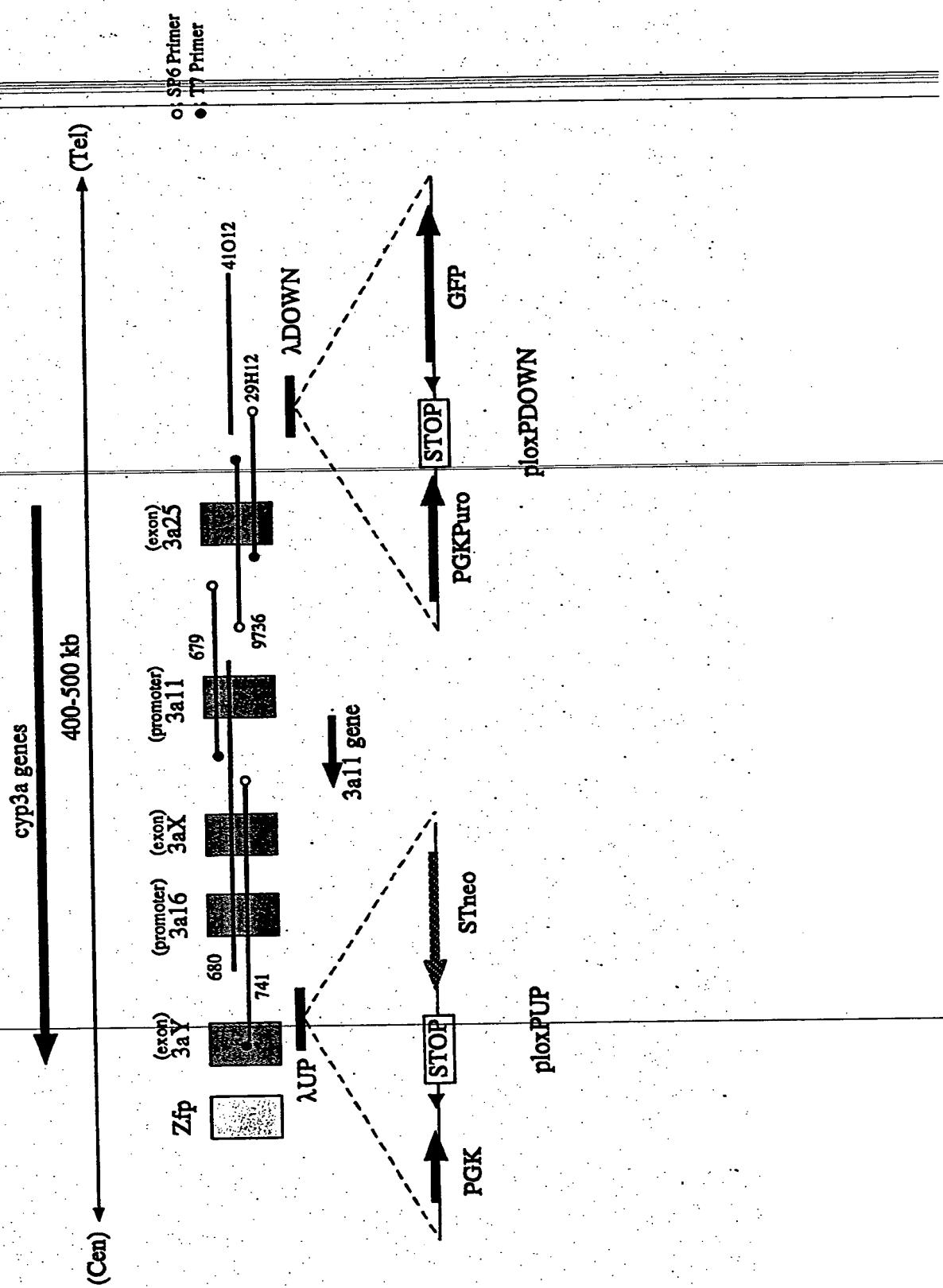
【図3】



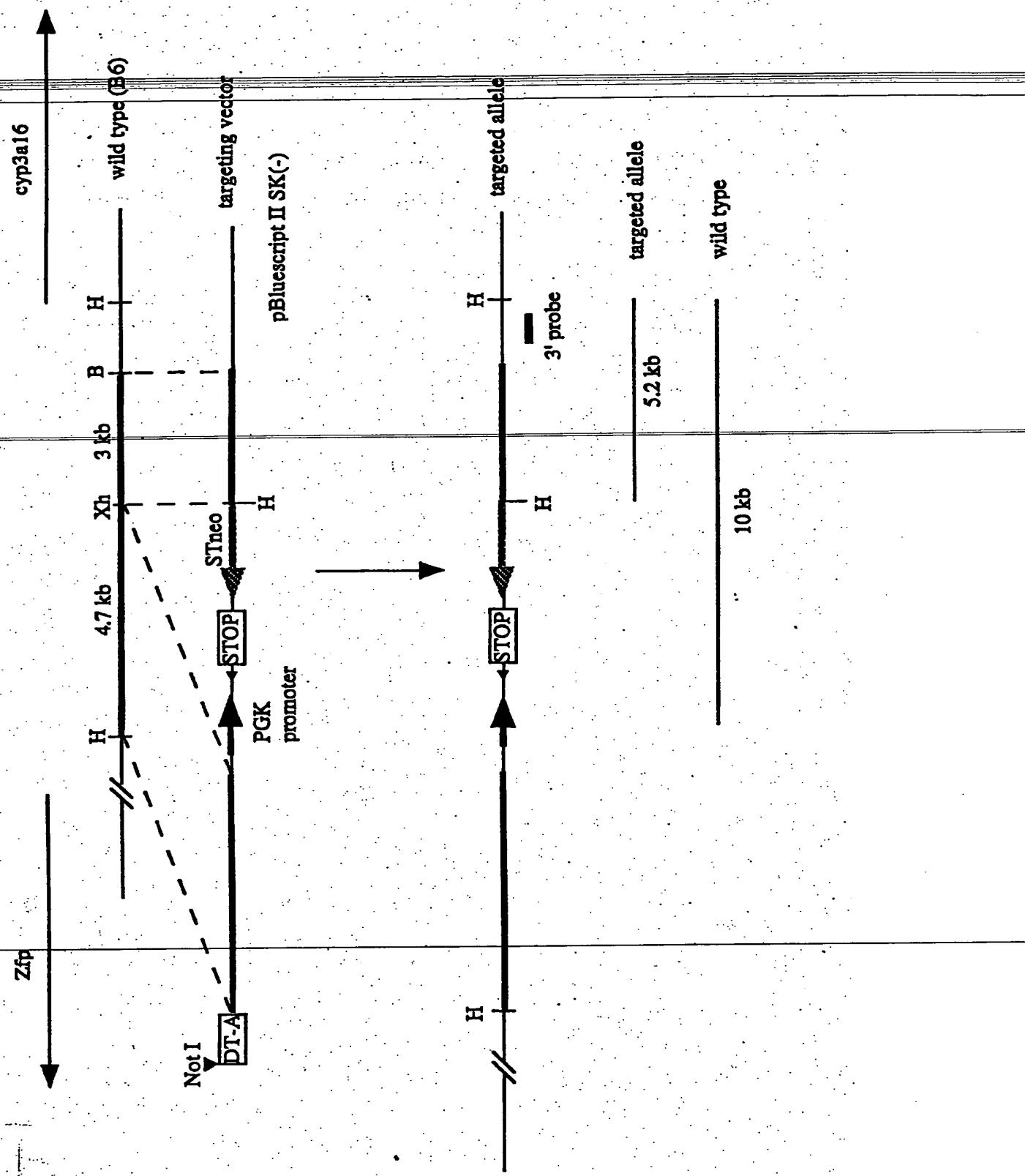
【図4】



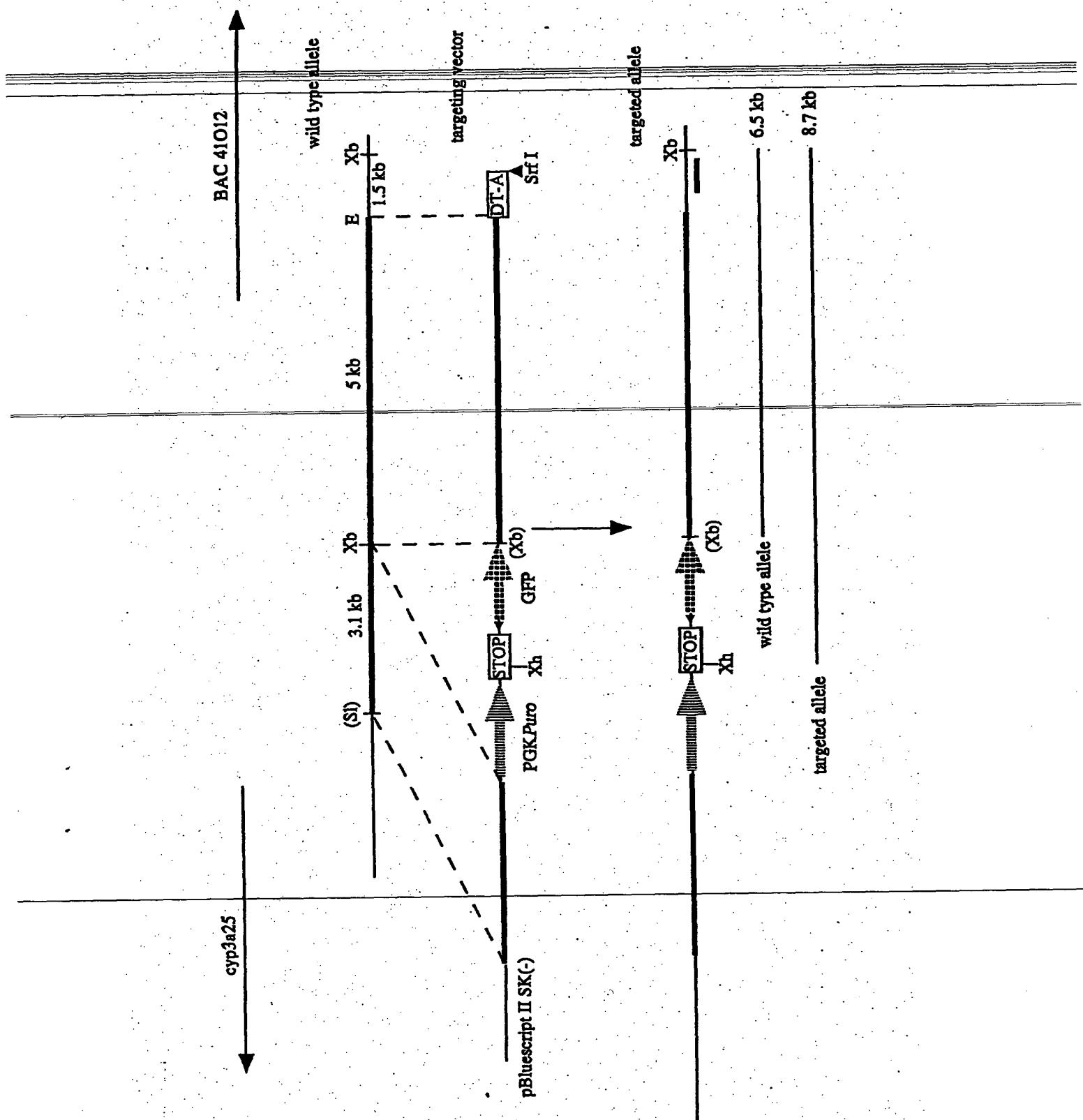
【図5】



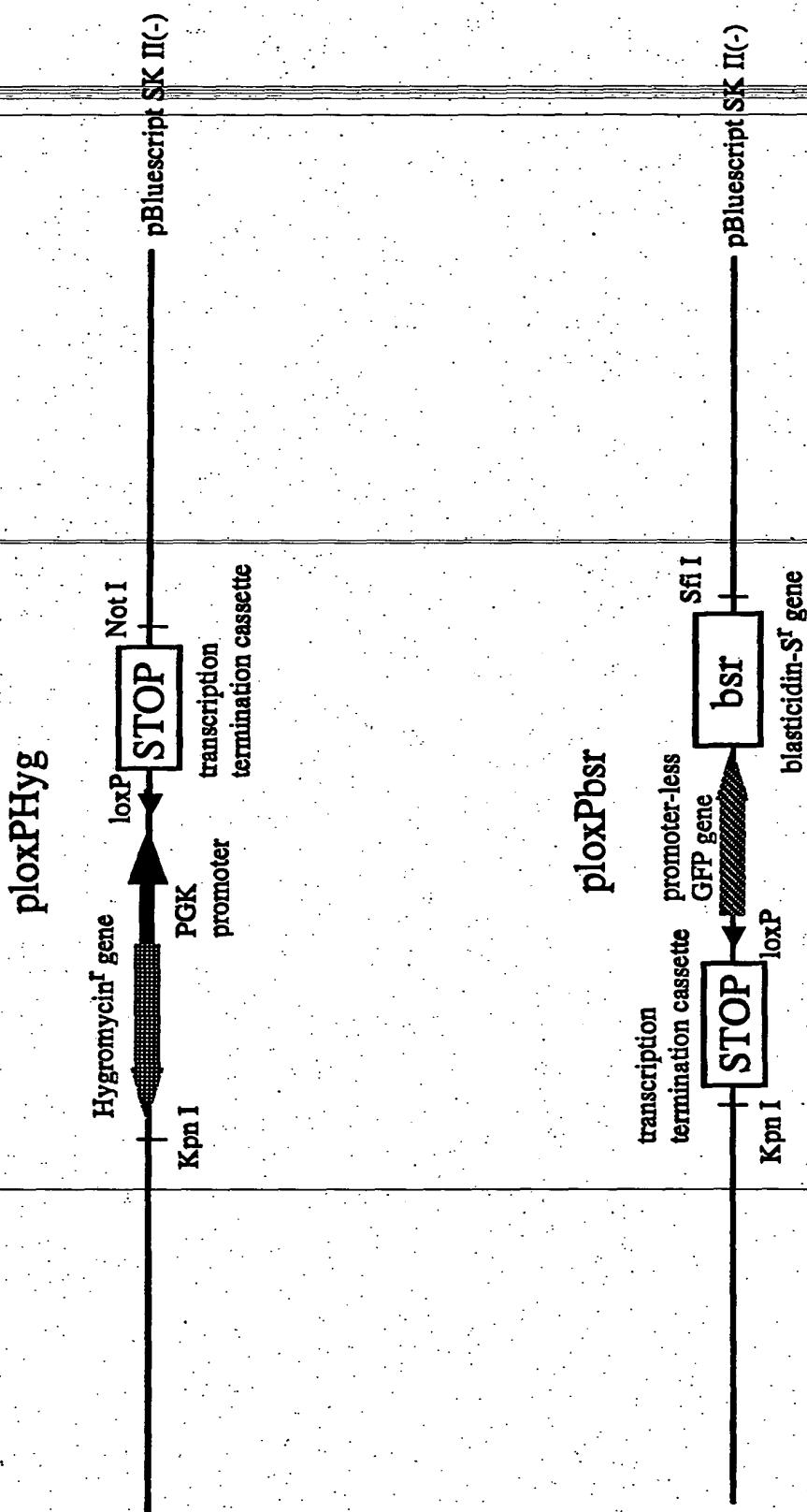
[図6]



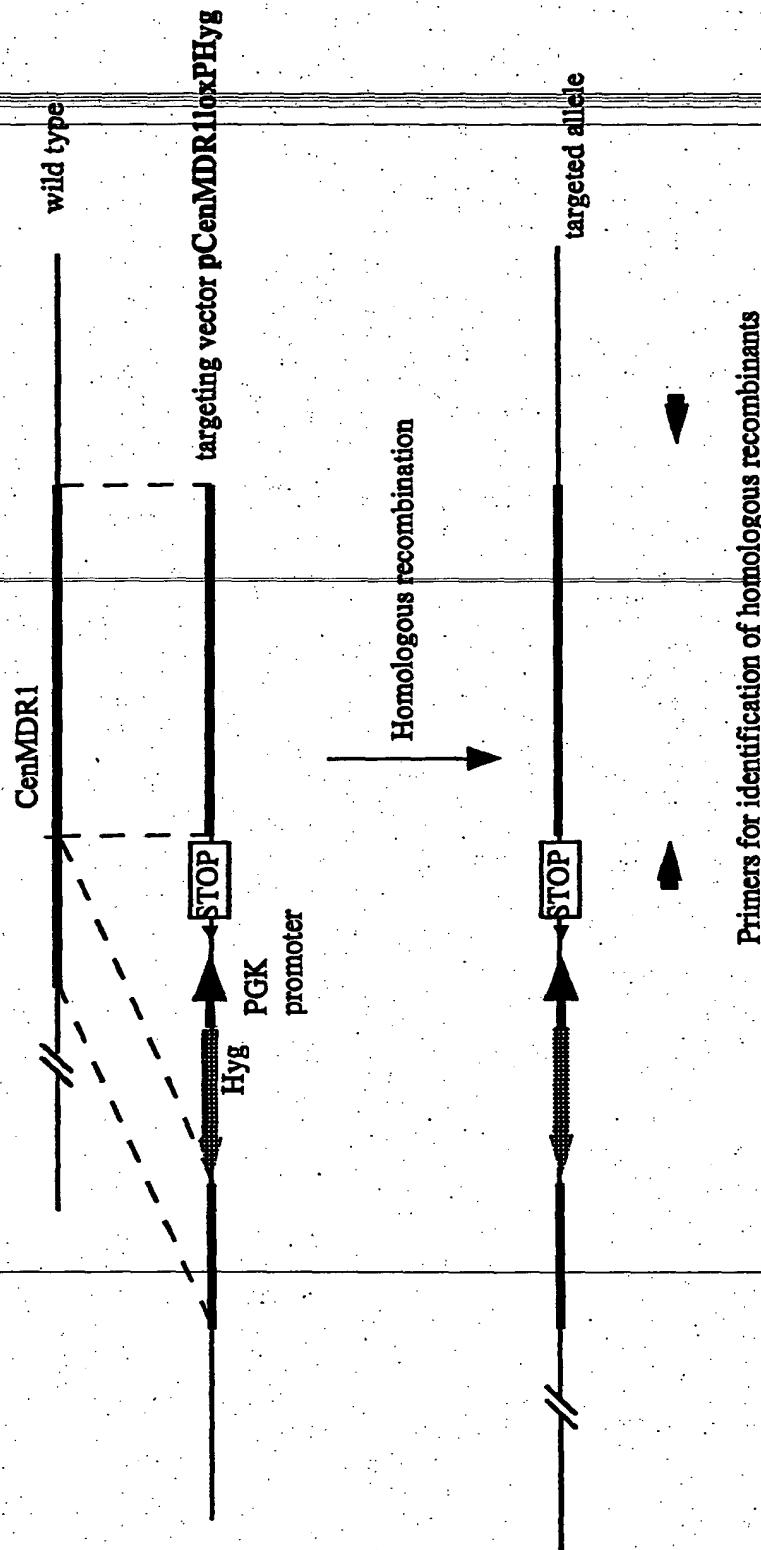
【図7】



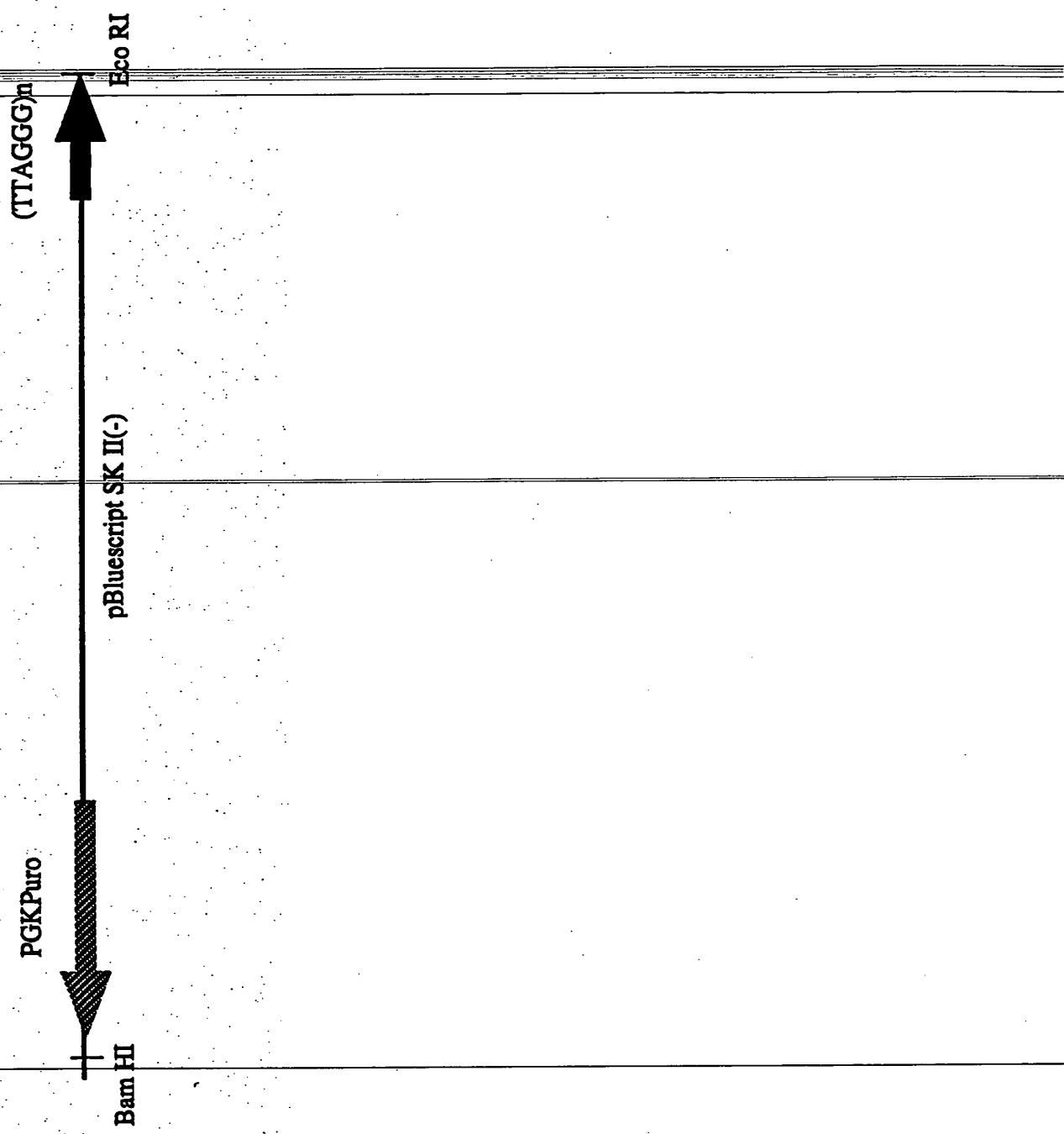
【図8】



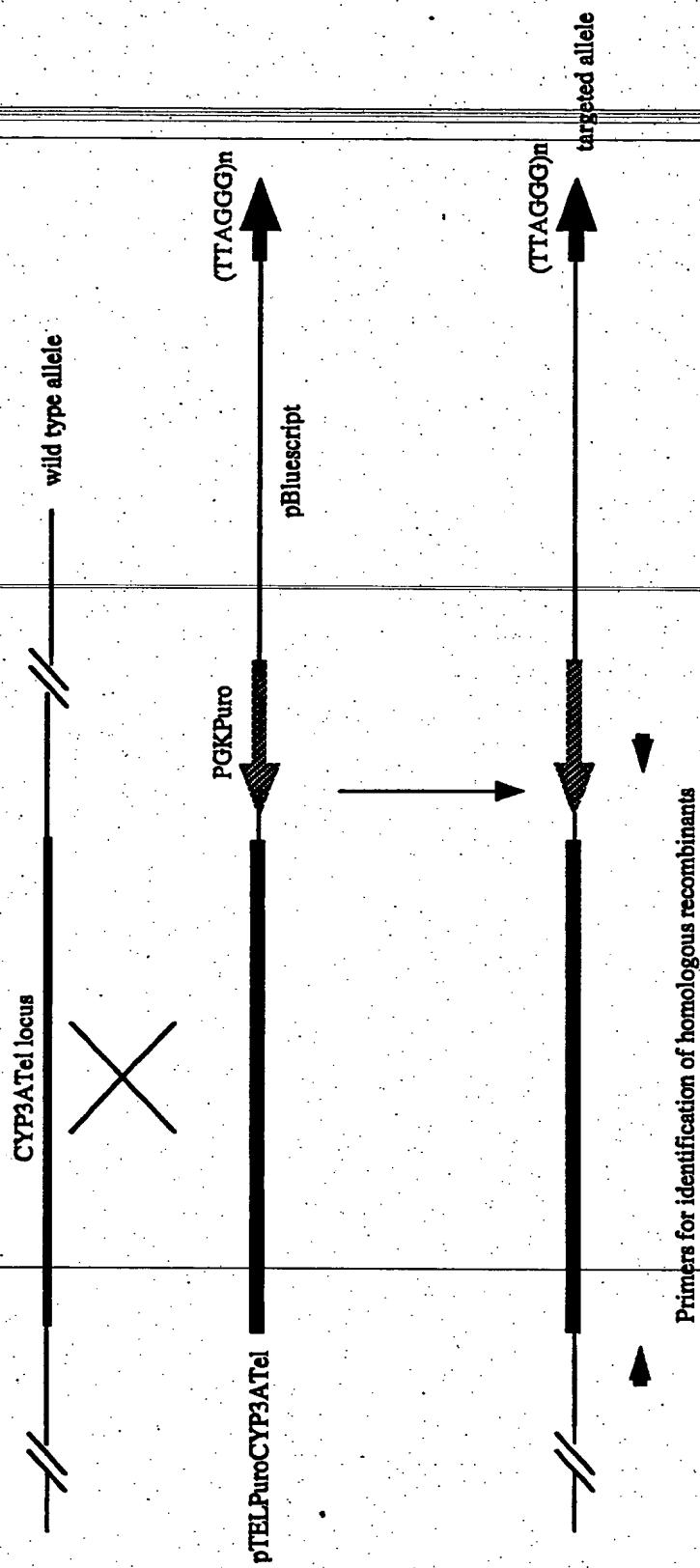
【図9】



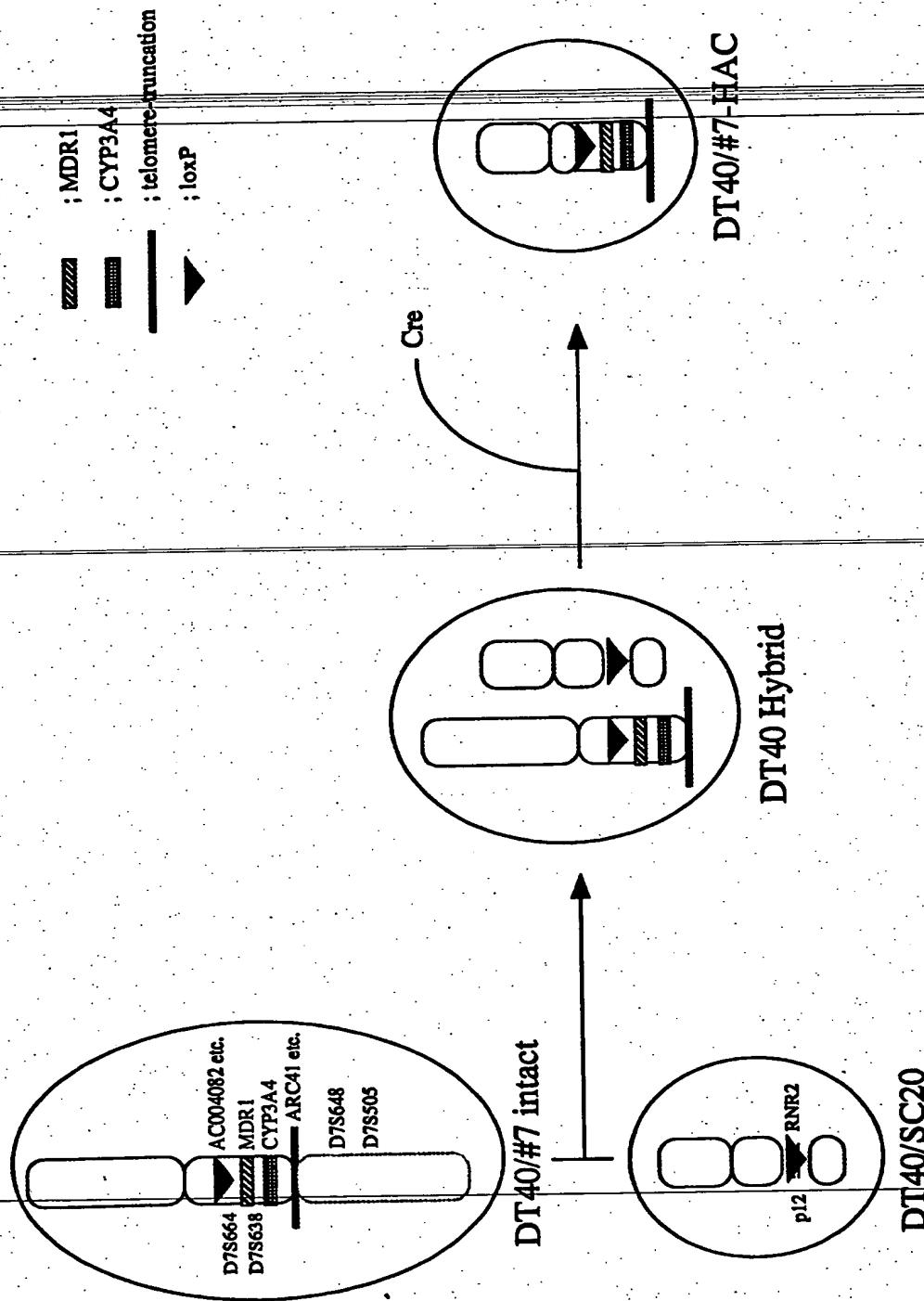
【図10】



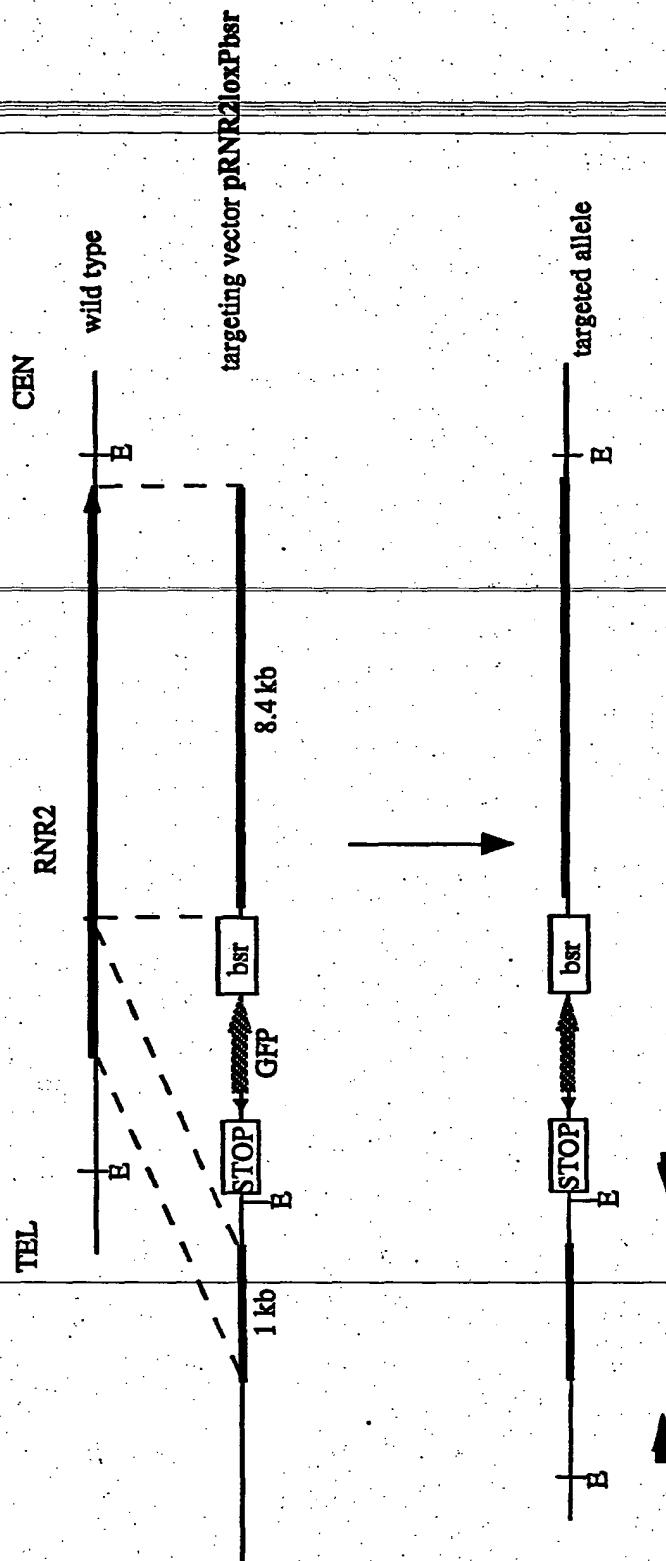
【図11】



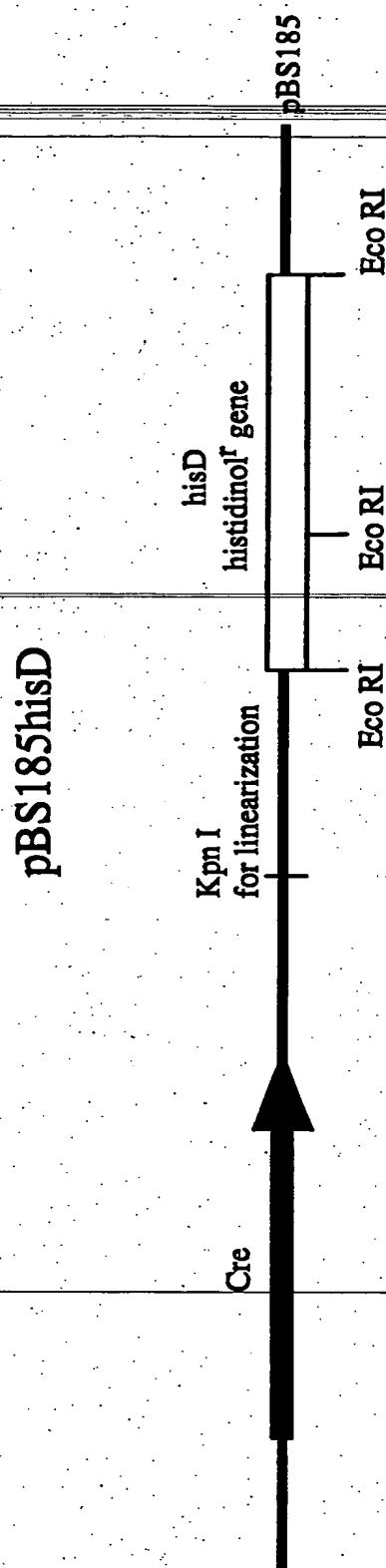
【図12】



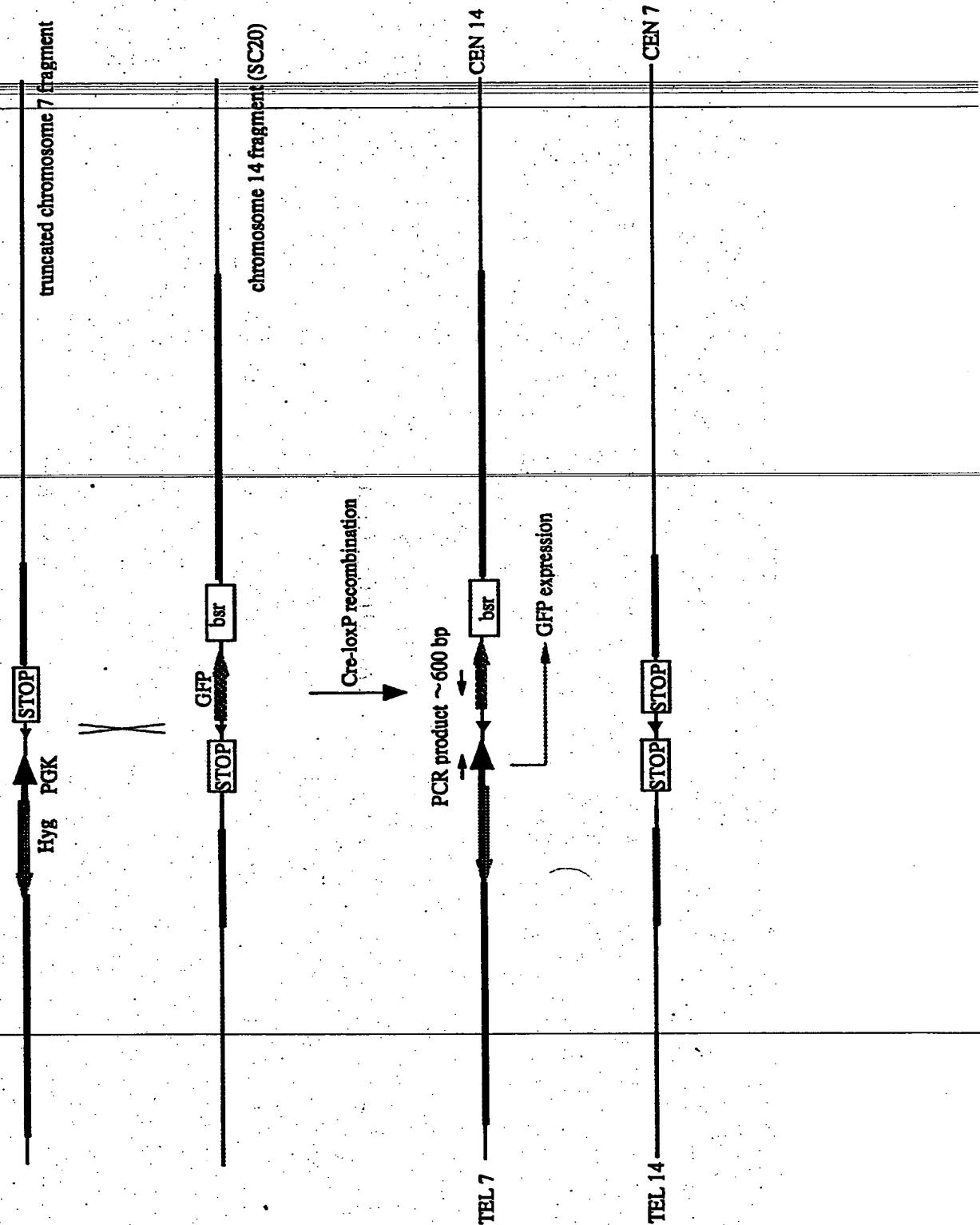
【図13】



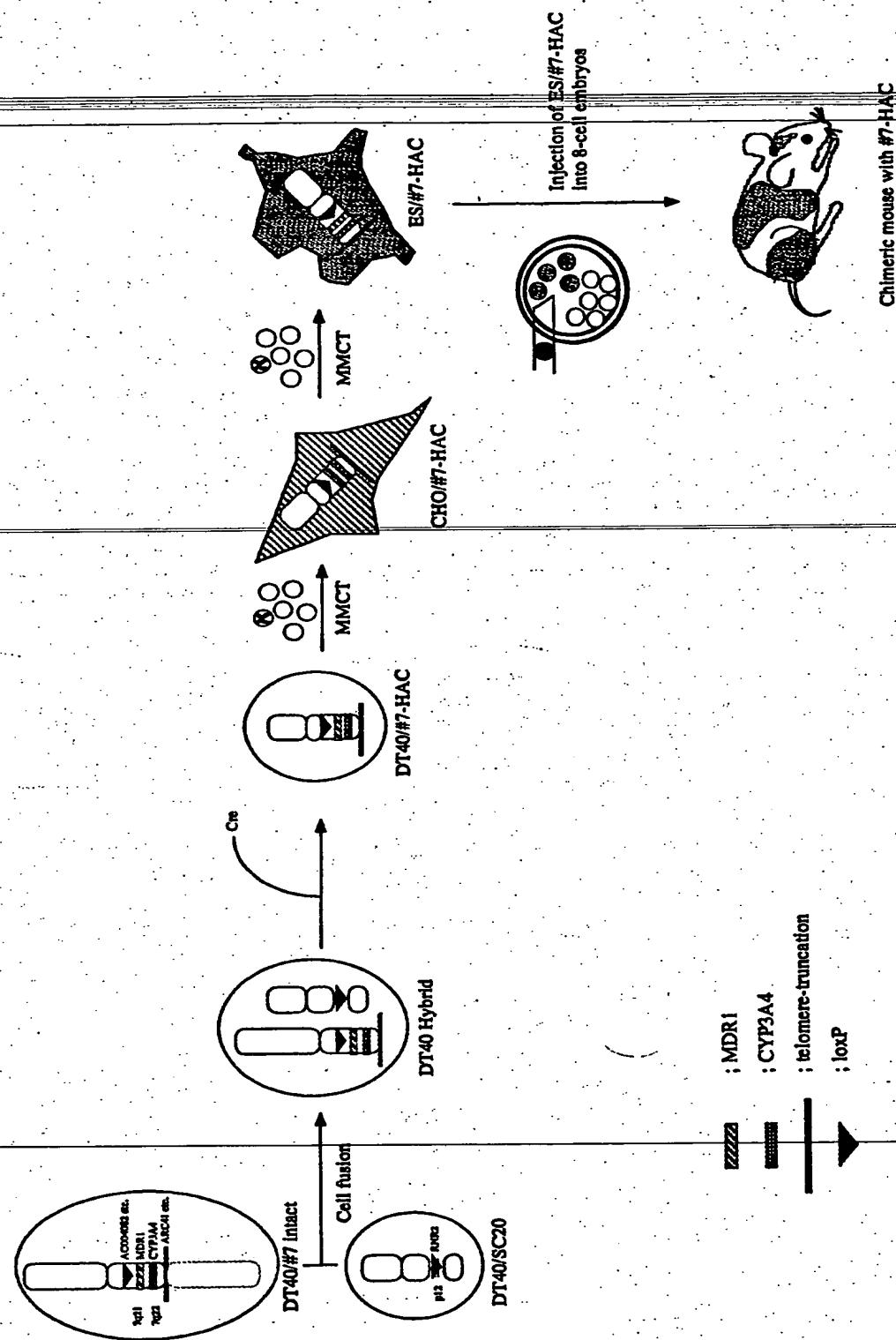
【図14】



【図15】



【図16】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 *in vivo*で薬物の代謝を調べるための改良されたモデル動物、特にヒトP450遺伝子を保持し、ヒト型の薬物代謝を行うモデル動物を提供する。

【解決手段】 ヒト正常線維芽細胞由来7番染色体の部分断片をミクロセル法によりマウスES細胞（胚性幹細胞）に導入し、このES細胞を用いて正常組織においてヒト染色体断片を保持し、薬剤の誘導によって肝臓、小腸においてヒトCY P3A4遺伝子を発現するキメラマウスを得る。また、マウス内在性P450遺伝子群を破壊するために、マウス5番染色体上のCyp3a遺伝子群に関する物理的 地図を作製するとともに、その物理的 地図をもとに遺伝子ターゲティングに必要なベクターを作製し、それを用いて、ヒトP450遺伝子（CYP3Aファミリー）を有し、さらにマウス内在性のP450遺伝子（Cyp3aファミリー）が破壊されたマウスを作製する。

【選択図】 図4

出願人履歴情報

識別番号 [000253503]

1. 変更年月日 1995年 6月14日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区新川二丁目10番1号

氏 名 麒麟麦酒株式会社

